

SÉRIE A, N° 1960

N° D'ORDRE : 2847

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques MONOD

Licencié ès Sciences
Assistant à la Faculté des Sciences
de l'Université de Paris

1^{re} THÈSE. — **Recherches sur la Croissance des Cultures bactériennes.**

2^e THÈSE. — **PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.**

Soutenues le 17 décembre 1941, devant la Commission d'examen.

MM. PÉREZ, *Président*

PLANTEFOL

GRASSÉ

} *Examineurs.*

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1941

Thèse Paris
1941

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Nom du Candidat : **MONOD**

Prénoms : **Jacques.**

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre :

MONOD (Jacques). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, Hermann, éditeur, 1941. In-8°, 210 pages.

Thèse Doct. Sciences (Université de Paris. 1942. N° 12847).

MONOD (Jacques). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, Hermann, éditeur, 1941. In-8°, 210 pages.

Thèse Doct. Sciences (Université de Paris. 1942. N° 12847).

MONOD (Jacques). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, Hermann, éditeur, 1941. In-8°, 210 pages.

Thèse Doct. Sciences (Université de Paris. 1942. N° 12847).

MONOD (Jacques). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, Hermann, éditeur, 1941. In-8°, 210 pages.

Thèse Doct. Sciences (Université de Paris. 1942. N° 12847).

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques MONOD

Licencié ès Sciences
Assistant à la Faculté des Sciences
de l'Université de Paris

1^{re} THÈSE. — **Recherches sur la Croissance des Cultures bactériennes.**

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 décembre 1941, devant la Commission d'examen.

MM. PÉREZ, *Président*

PLANTEFOL } *Examineurs.*
GRASSÉ }

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1941

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyens honoraires . . M. MOLLIARD.

M. CH. MAURAIN.

Doyen. M. P. MONTEL, Professeur, Théorie des fonctions.

Professeurs honoraires



Emile PICARD.
Léon BRILLOUIN.
PÉCHARD.
FREUNDLER.
AUGER.
DANGEARD.
LESPIEAU.
VESSIOT.

PORTIER.
LAPICQUE.
G. BERTRAND.
Ch. FABRY.
Léon BERTRAND.
GUILLIERMOND
WINTREBERT.
DUBOSCQ.

BOHN.
RABAUD.
CAULLERY.
CARTAN.
E. BOREL.
COTTON.
DRACH.

PROFESSEURS

Charles PÉREZ. . . T Zoologie.
M. GUICHARD. . . T Analyse et mesures chimiques.
L. BLARINGHEM. . T Botanique.
G. JULIA. T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
C. MAUGUIN. . . . T Minéralogie.
A. DENJOY. T Géométrie supérieure.
L. LUTAUD. T Géographie physique et Géologie dynamique.
G. BRUHAT. T Physique théorique et Physique céleste.
E. DARMOIS. . . . T Enseignement de Physique.
A. DEBIERNÉ. . . . T Physique générale et Radioactivité.
A. DUFOUR. T Physique (P. C. B.).
L. DUNOYER. Optique appliquée.
M. JAVILLIER. . . . T Chimie biologique.
Henri VILLAT. . . . T Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB. T Géologie.
P. PASCAL. T Chimie générale.
M. FRÉCHET. T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. ESCLANGON. . . T Astronomie.
M^{me} RAMART-LUCAS. T Chimie organique.
H. BÉGHIN. T Mécanique physique et expérimentale.
FOCH. T Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER. . . . Physique (P. C. B.).
De BROGLIE. T Théories physiques.
CHRÉTIEN. Optique appliquée.
LABROUSTE. Physique du Globe.
PRENANT. T Anatomie et Histologie comparées.
VILLEY. Mécanique physique et expérimentale.
COMBES. T Physiologie végétale.
GARNIER. T Application de l'analyse à la géométrie.

PÉRÈS. Mécanique rationnelle.
HACKSFILL. T Chimie minérale.
TOUSSAINT. Technique Aéronautique.
M. CURIE. Physique (P. C. B.).
G. RIBAUD. T Hautes températures.
CHAZY. T Mécanique rationnelle.
GAULT. Chimie (P. C. B.).
CROZE. Recherches physiques.
DUPONT. T Théories chimiques.
LANQUINE. T Géologie structurale et Géologie appliquée.
VALIRON. T Calcul différentiel et intégral.
BARRABÉ. Géologie structurale et géologie appliquée.
MILLOT. Biologie animale (P. C. B.).
F. FERRIN. Théories physiques.
VAYON. Chimie organique.
G. DARMOIS. Calcul des probabilités et Physique mathématique.
CHATTON. T Biologie maritime.
AUBEL. Chimie biologique.
J. BOURCART. . . . Géographie physique et Géologie dynamique.
M^{me} JOLIOT-CURIE. . Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL. Biologie végétale (P. C. B.).
CABANNES. Enseignement de Physique.
GRASSÉ. T Zoologie (Evolution des êtres organisés).
PRÉVOST. Chimie organique.
BOULIGAND. Mathématiques.
CHAUDRON. Chimie (P. C. B.).
WYART. Minéralogie.
TEISSIER. Zoologie.
MANGENOT. Biologie végét. (P. C. B.).
P. AUGER. Physique.
MONNIER. Physiologie générale.
PIVETEAU. Géologie.
ROGARD. Physique.
H. CARTAN. Calcul différentiel.

Secrétaire. A. PACAUD.

Secrétaire honoraire. . . D. TOMBECK.

A MON PÈRE

ET

A MA FEMME



Digitized by the Internet Archive
in 2026



INTRODUCTION

Si la détermination des coefficients de croissance n'a pas encore pris en physiologie bactérienne l'importance qu'elle pourrait avoir, c'est que, dans les conditions habituelles, la croissance d'une culture bactérienne est un phénomène fort complexe, dont de nombreuses conditions contribuent à limiter la rapidité et la durée. La signification physiologique des constantes de croissance dépend de la nature et du nombre de ces facteurs limitants, elle est indéterminée lorsque ceux-ci le sont. Dans la *première partie* de ce travail on a cherché à montrer que dans certaines conditions expérimentales, facilement réalisables d'ailleurs, la croissance n'est limitée que par une seule condition : la concentration du milieu en substances alimentaires, et obéit à des lois très simples. Les coefficients de croissance prennent alors un sens précis, et sont utilisables comme constantes physiologiques : le *taux de croissance* (1) exprime l'activité des réactions de synthèse ; l'accroissement total de la culture est proportionnel au *rendement de la croissance* (2). Après avoir, dans le premier chapitre, rappelé les

(1) Nous verrons au cours du premier chapitre pourquoi le *taux de croissance* doit être considéré plutôt que la vitesse de multiplication, dont la signification est moins bien définie.

(2) On entendra ici, provisoirement, sous le nom de rendement, le rapport :

$$\frac{\text{Croissance totale}}{\text{Concentration de l'aliment}}$$

Seule la suite de cet exposé pourra montrer que ce quotient constitue effectivement, dans certains cas, une mesure du « rendement matériel brut » de la croissance, au sens où cette expression est entendue d'ordinaire (voir page 51).

caractères généraux de la croissance des cultures bactériennes, on étudiera les variations de ces deux paramètres en fonction de la concentration des substances alimentaires, de la nature de certains aliments (en particulier de la source carbonée) et de la température. On cherchera en outre si il existe une relation entre ces deux constantes, et si le rendement varie au cours de la croissance. On espère montrer au cours de cet exposé que l'étude quantitative de la croissance permet de poser expérimentalement certains problèmes qui jusqu'ici n'ont presque pas été abordés en physiologie bactérienne : en particulier l'influence de la structure chimique des substrats sur l'activité et le rendement des réactions de synthèse. Le dernier chapitre de cette première partie sera consacré à la discussion des principales représentations analytiques de la croissance et des hypothèses qu'elles expriment.

La *seconde partie* est consacrée à l'étude particulière d'un phénomène auquel j'ai donné le nom de « diauxie », parce qu'il s'exprime dans la croissance sous la forme de deux poussées successives séparées par une phase de croissance nulle. Sans vouloir anticiper sur les conclusions de ce travail, on peut indiquer que ce phénomène est lié à une variation de pouvoir enzymatique, qui se produit en présence de certains mélanges de glucides. Plus précisément il semble qu'il s'agisse d'un phénomène de *suppression d'enzyme*. Au cours de cette seconde partie on aura constamment l'occasion d'utiliser et d'appliquer les résultats généraux consignés dans la première. On pourra ainsi se rendre compte des services que peut rendre l'analyse quantitative de la croissance en physiologie bactérienne.

* * *

Ce travail a été entièrement fait dans le laboratoire de Zoologie de la Sorbonne, dont la confiance de Monsieur le Professeur PEREZ, membre de l'Institut, m'a ouvert les portes en 1934. Sa générosité et sa bienveillance m'ont permis de la mener à bien. Je suis heureux de lui adresser ici le témoignage de ma gratitude et de ma respectueuse affection.

C'est à Monsieur le Professeur CHATTON que je dois mon initiation à la recherche scientifique, initiation qui a eu, pour la suite de ma carrière, une importance déterminante. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression d'une reconnaissance fidèle.

J'adresse ici mes remerciements à Monsieur le Professeur CAUL-LERY, qui a bien voulu s'intéresser à mon activité scientifique et m'a accueilli pendant deux années dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute la reconnaissance que j'éprouve à l'endroit de Monsieur le Professeur PLANTEFOL. L'intérêt qu'il a bien voulu montrer pour ce travail, ses critiques, ses suggestions, sont pour moi une aide et un encouragement précieux. Je tiens également à remercier vivement Monsieur le Professeur GRASSÉ, et Monsieur le Professeur AUBEL, qui ont bien voulu, à diverses reprises, s'intéresser à mes recherches.

Ce travail doit beaucoup aux suggestions et aux critiques de Monsieur André LWOFF, Chef de Service à l'Institut Pasteur. Sans l'aide qu'il m'a généreusement donnée, ces recherches n'eussent pas atteint leur plein développement. Je tiens à lui exprimer mes sentiments de sincère gratitude.

Je ne voudrais pas que le témoignage de mon affectueuse reconnaissance manque ici à mon ami François MORIN, dont la collaboration m'a été constamment précieuse, et bien souvent indispensable.

Enfin je voudrais pouvoir dire tout ce que je dois à Monsieur le Professeur TEISSIER. Sans lui ce travail n'aurait jamais été commencé ; et, sans ses conseils, ses encouragements, son amical intérêt, sans le constant enrichissement de conversations journalières, il n'eut jamais été mené à bien.



PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

Les phases de la croissance.

On ne tentera pas de donner ici un historique tant soit peu complet des travaux relatifs à la croissance des microorganismes. La confrontation des nombreux travaux relatifs à cette question serait sans grand profit, car ces travaux reflètent des tendances trop variées, des efforts trop dispersés, pour qu'il soit possible d'en faire un résumé logique.

On se contentera, pour ce chapitre introductif, de résumer les caractéristiques permanentes de la croissance et sa division en phases successives. On cherchera à dégager la valeur significative de ces différentes phases, leur interprétation générale, le rôle que chacune d'entre elles peut jouer dans l'analyse des processus de croissance. On aura ainsi l'occasion de rappeler quelques résultats essentiels, et aussi de définir une fois pour toutes les termes et les symboles utilisés au cours de ce travail. Il sera nécessaire de s'étendre plus particulièrement sur la phase dite de « latence ». On sait que cette période de la vie des cultures a attiré jusqu'ici, et peut-être injustement, plus d'attention que les phases de croissance proprement dites. C'est pourquoi il faudra s'y arrêter quelque peu, afin de n'avoir plus à y revenir au cours de ce travail, où cette question ne joue qu'un rôle contingent.

Tout d'abord, il sera bon de définir quelques termes pouvant prêter à confusion. On appellera ici « densité » d'une culture, la *concentration de cette culture en substance vivante*. Il est préférable en effet de renoncer à prendre pour base le *nombre d'individus par unité de*

volume, variable moins intéressante en général que la quantité de substance vivante, et qui n'a avec cette dernière que des rapports difficilement déterminables (Voir page 20).

On appellera « taux de croissance » la *vitesse de croissance par unité de densité*. Nous verrons également plus loin que cette grandeur n'est assimilable à la vitesse de division que moyennant certaines restrictions. Cependant il est commode de l'exprimer sous cette forme (nombre de divisions à l'heure) (1).

* * *

Tous les auteurs sont d'accord pour distinguer dans la croissance des cultures bactériennes un certain nombre de phases caractérisées par certaines valeurs, ou du moins par certaines variations de la valeur du taux de croissance. Ces différentes phases sont mises en évidence par la figure 1, qui exprime une croissance typique, en coordonnées normales (courbe A) semi-logarithmiques (courbe B) et les variations du taux de croissance (courbe C). On peut y reconnaître huit phases successives :

I) Une phase de croissance nulle.

II) Une phase d'accélération du taux de croissance.

(Ces deux phases composent ce que l'on entend le plus souvent sous le nom de phase de latence) (2).

III) Une phase de croissance à taux constant, généralement appelée phase logarithmique, et qu'il paraît plus logique d'appeler « phase exponentielle ».

IV) Une phase de ralentissement du taux de croissance.

V) Une phase à taux de croissance nul : « phase maximum ».

VI, VII, VIII). Une période de décroissance qui peut le plus souvent se décomposer en trois phases : pendant la première, le taux de

(1) On emploie le plus souvent en bactériologie les expressions : « vitesse de multiplication », ou « vitesse de croissance », dont la signification varie suivant les auteurs, qui l'appliquent tantôt à la culture dans son ensemble tantôt aux individus. Il est préférable d'adopter l'expression : « taux de croissance », qui est consacrée par l'usage des biométriciens, et ne peut prêter à confusion.

(2) Certains auteurs n'entendent sous le nom de phase de latence que la première, pendant laquelle le taux de croissance est nul.

croissance, devenu négatif, augmente en valeur absolue ; pendant la seconde, il demeure constant ; pendant la dernière, il diminue en valeur absolue.

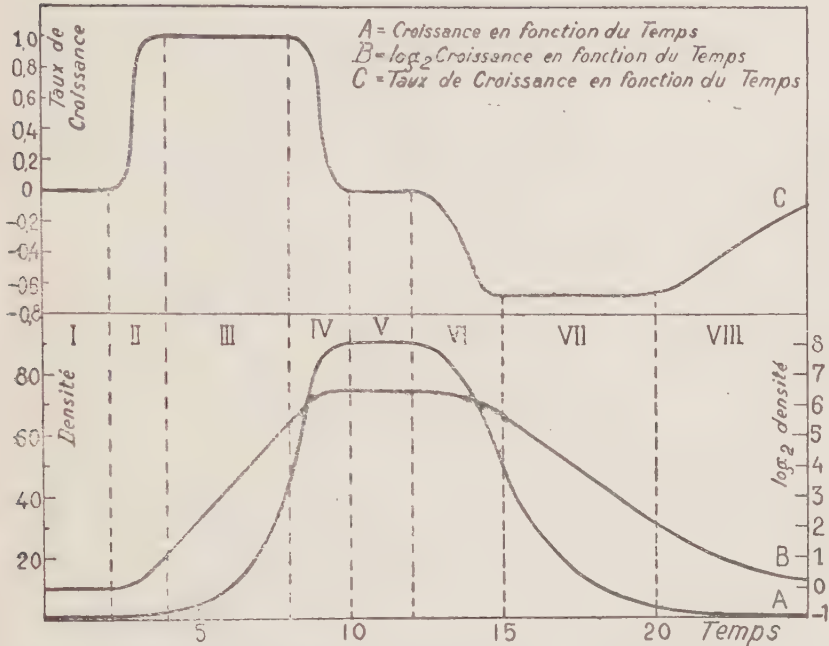


FIG. 1. — Croissance typique d'une culture bactérienne (en coordonnées normales et semi-logarithmiques) et variations du taux de croissance au cours des différentes phases. Les chiffres romains désignent les phases successives dont les limites sont indiquées par les traits interrompus verticaux (v. texte p. 6).

Phase de latence.

D'après la définition donnée plus haut, la phase de latence (on dit souvent le temps de latence) comprend la période qui s'étend entre l'inoculation et le moment où s'établit le taux de croissance constant (et maximum) caractéristique de la phase exponentielle. Pendant cette période le taux de croissance est nul, ou faiblement positif, parfois même la courbe débute par une chute brusque, le taux de croissance prenant des valeurs négatives. Depuis la découverte de ce phénomène par Max MULLER (1895), d'innombrables travaux lui ont été consacrés (1).

(1) L'étude de la phase de latence a suscité à elle seule plus de recherches que la croissance elle-même.

On désire montrer ici que les facteurs qui déterminent la durée et la forme de la phase de latence sont (au moins en règle générale) sans effet sur le reste de la croissance et qu'il n'existe pas de lien nécessaire, direct ou indirect, entre la phase de latence et les autres phases de la croissance. En d'autres termes, qu'il s'agit d'un phénomène contingent en ce qui concerne la croissance proprement dite. Voyons d'abord, d'après différents auteurs, quels sont les facteurs dont peut dépendre le « temps de latence » (1). On peut, pour simplifier, les classer en trois groupes :

- A) Ceux qui dépendent de l'origine de l'inoculat.
- B) Ceux qui dépendent de la nature du milieu inoculé.
- C) Ceux qui dépendent de la grandeur de l'inoculat.

A) Facteurs dépendant de l'origine de l'inoculat.

1^o *Changement de milieu.* — L'expérience journalière de tous les bactériologistes enseigne, et MULLER le premier l'a formellement démontré, que lorsqu'on repique une souche d'un milieu auquel elle est accoutumée dans un autre, la croissance dans ce nouveau milieu ne s'amorce pas aussitôt ; le temps de latence est particulièrement marqué. (Nous verrons dans la dernière partie de ce travail que ce fait peut, dans certains cas, trouver une explication précise dans la notion d'« enzymes adaptatifs » due à KARSTROM).

2^o *Age de l'inoculat.* La durée de la phase de latence dépend dans une très large mesure de la phase de croissance où se trouve la culture souche au moment du repiquage. Ceci résultait déjà des premiers essais de MULLER et a été confirmé par de nombreux auteurs (2). J'ai eu de très nombreuses occasions de le vérifier. Lorsque le repiquage ne comporte pas de changement de milieu, et que l'on opère pendant la phase exponentielle de la culture souche, on arrive souvent à supprimer complètement la phase de latence. La croissance débute par la phase exponentielle. Le temps de latence réap-

(1) Il ne saurait être question ici de passer en revue l'abondante littérature de la phase de latence. On en trouvera un excellent exposé dans BUCHANAN (1928) fidèlement reproduit par DAVID, 1931.

(2) Citons principalement LANE CLAYTON (1909), PENFOLD (1914), BARBER (1908) et PHELPS (1935) qui a retrouvé ces résultats avec des cultures de *Cilié (Glaucoma piriformis)*.

paraît, au contraire, lorsque le repiquage est fait une fois la phase exponentielle dépassée. Il tend à s'allonger lorsque l'on opère avec des cultures de plus en plus vieilles (1) (Voir par exemple la fig. 3).

3° *Traitements antérieurement subis par la souche.* — Un certain nombre d'auteurs ont montré que (comme on devait s'y attendre) la phase de latence pouvait être fort longue lorsque la souche repiquée avait préalablement subi une altération (par la chaleur ou les antiseptiques). Cela va de soi. Notons qu'on arrive ainsi à obtenir des temps de latence extraordinairement prolongés (2).

B) *Facteurs dépendant de la nature du milieu.*

La nature du milieuensemencé joue un rôle important dans la durée du temps de latence, et cela, même lorsque l'on ensemence

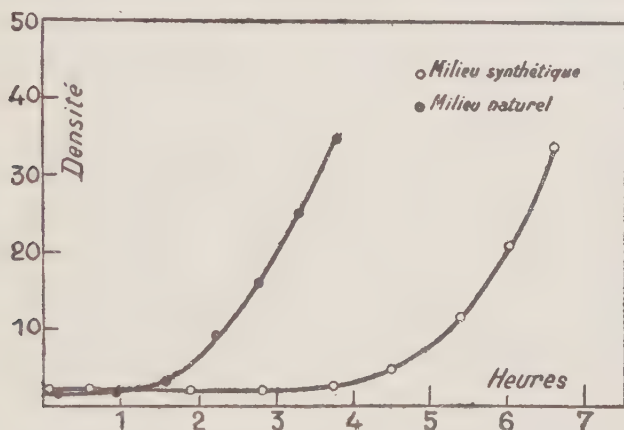


FIG. 2. — Début de la croissance de deux cultures de *B. subtilis*, en milieu synthétique et en bouillon. La phase de latence est beaucoup plus marquée en milieu synthétique.

des souches déjà longuement accoutumées au milieu envisagé. MULLER (*loc. cit.*) avait déjà fait cette remarque, et PENFOLD (1914) a étudié quelques cas précis. Je l'ai également maintes fois observé.

(1) PENFOLD pense que cet allongement n'est pas indéfini, et atteint assez vite une limite. Pourtant il arrive toujours un moment, pour toute culture, où elle cesse d'être repiquable. C'est là, semble-t-il, la seule limite « absolue » du temps de latence.

(2) ESTY et MEYER (1922) ont observé un temps de latence de 39 jours avec des spores de Bacille botulique chauffées.

Cela est particulièrement évident lorsque l'on compare des milieux synthétiques et des milieux naturels. Avec le Colibacille, et plus encore avec le *B. subtilis*, on obtient toujours, toutes choses égales d'ailleurs, des temps de latence plus longs en milieu synthétique qu'en milieu naturel. La figure 2 donnera une idée de l'importance de cet effet. Il s'agit de deux cultures de *B. subtilis*, l'une sur bouillon de cervelle de veau, l'autre sur milieu synthétique (1). Toutes deux sont repiquées 2 heures après le maximum. Le temps de latence, fort peu marqué dans le premier cas, dure près de 4 heures dans le second. On observe aussi des différences considérables dans la durée du temps de latence suivant le mode de préparation de l'eau distillée ayant servi à la confection du milieu. Mais cela n'est vrai qu'en milieu synthétique. Les différences de cet ordre sont insensibles en milieux complexes.

C) Facteurs dépendant de la grandeur de l'inoculat.

Tous les Bactériologistes connaissent cet effet dont ils ont à tenir compte dans la pratique quotidienne des repiquages et de l'entretien des cultures. On sait que cette question est à l'origine d'une foule de travaux dont beaucoup sortent du domaine de la physiologie bactérienne (2) et qu'elle a été le point de départ de la célèbre théorie de l'allélocatalyse, sur laquelle nous aurons l'occasion de revenir tout à l'heure. Rappelons simplement que le temps de latence est presque toujours beaucoup plus long avec desensemencements faibles qu'avec desensemencements larges. Cet effet est souvent si marqué, qu'il se traduit par l'impossibilité d'entretenir une souche avec de faiblesensemencements, sur certains milieux qui, par ailleurs, peuvent être très favorables, fournir des cultures très denses, et permettre dans de bonnes conditions l'entretien indéfini de la souche. C'est le cas, en particulier, avec certains milieux synthétiques.

(1) Milieu *S* + Saccharose. Voir p. 38, la composition de ce milieu.

(2) Citons en particulier les beaux travaux de BOHN et DRZEWINA (1920 et suiv.) sur les *Convoluta*, le sperme d'Oursin, les Ciliés, etc... et les travaux de LILLIE (1919). Bonne mise au point de ALLEE (1927).

Hypothèses émises pour expliquer le temps de latence.

Il résulte de ce qui précède que la phase de latence représente un phénomène complexe, soumis à de nombreuses conditions. Aussi a-t-il donné lieu à quantité de théories (1), dont beaucoup ne méritent pas ce nom, soit qu'elles n'expriment que des lieux communs, soit au contraire qu'elles dépassent leur objet en envergure, et surtout en prétentions. Il vaut mieux renoncer à exposer, fût-ce dans leur principe, ces différentes hypothèses. On ne pourrait tirer profit de cet exposé qu'à titre d'exemple de la confusion dans laquelle sont tombées un certain nombre de questions relatives à la croissance.

L'une d'entr'elles cependant doit nous retenir, à cause du grand intérêt qu'elle a suscité, et surtout parce qu'il importe d'en faire justice pour la suite de cet exposé. Il s'agit de la théorie de l'Allélo-catalyse, due à ROBERTSON (1921 et suiv.). On sait que cet auteur, se basant sur des observations faites avec des ciliés, crut pouvoir affirmer que des cellules *isolées* croissaient et se divisaient moins vite que lorsqu'elles étaient groupées au sein du même milieu. Tout se passe, pensait ROBERTSON, comme si la croissance de chaque cellule était catalysée par la présence des autres. Le taux de croissance doit donc s'accroître à mesure que s'accroît la densité de la culture.

Or c'est précisément ce qui se produit pendant la phase de latence, et l'explication est séduisante. Quelques auteurs adoptèrent l'interprétation de ROBERTSON ; mais d'autres la repoussèrent et nièrent jusqu'à la matérialité des faits qui servaient de base à la théorie. Après une longue controverse, il semble bien que le dernier mot soit resté aux opposants, et en particulier à CUTLER et CRUMP (1923 et suiv.). Quoiqu'il en soit, il semble qu'un raisonnement assez simple suffise à écarter cette interprétation, au moins dans beaucoup de cas : chaque fois qu'il est possible, tout en pratiquant des ensemencements relativement faibles, de supprimer complètement la phase de latence. Or, à la seule condition de pratiquer les repiquages pendant la phase exponentielle, ce résultat a pu être obtenu avec toutes les souches utilisées au cours de ce travail. D'autres auparavant (Mac KENDRICK et PAI 1911, CHESNEY 1916, PHELPS 1934, REGNIER et LAMBIN 1927) avaient obtenu ce résultat. Mais la démon-

(1) BUCHANAN (1928) en compte sept.

tration la plus péremptoire est due à BARBER (1908) puisque cet auteur procédait au repiquage par *isolement* de ses bactéries (Coli-bacilles). L'explication allélocatalytique du temps de latence, qui exige que ce phénomène se produise *toujours*, ou en tous cas chaque fois que les organismes sont suffisamment dilués dans leur milieu, n'aura donc pas à entrer en ligne de compte au cours de ce travail.

Interprétation générale de la phase de latence.

Il résulte de tout ce qui précède qu'il serait vain de chercher une interprétation générale de la phase de latence. On doit se demander cependant quels en sont les facteurs déterminants les plus importants. Ceux-ci peuvent se réduire à deux :

1° Dans tous les cas où le temps de latence peut être supprimé complètement par repiquage pendant la phase exponentielle il est évident qu'il ne dépend que de l'état physiologique de la culture souche. Sans faire de cette interprétation une « théorie » on peut se contenter d'admettre que les bactéries prélevées après la phase exponentielle sont des organismes altérés, soit par intoxication, soit par inanition, suivant les conditions de la culture. La phase de latence représente le temps nécessaire pour que les conditions physiologiques optimum soient à nouveau réalisées. Cela est tout simple (1).

2° Avec certains milieux cependant il est impossible, par simple repiquage pendant la phase exponentielle, de supprimer complètement le temps de latence. C'est le cas, en particulier, de beaucoup de milieux synthétiques. L'interprétation la plus simple, dans ce cas, est d'admettre que ces milieux contiennent de faibles doses de substances toxiques. La croissance au taux maximum ne pourrait s'établir qu'une fois cet effet toxique neutralisé. Il est probable que les substances toxiques en cause sont des ions métalliques présents à l'état de traces. Cette interprétation rend compte de beaucoup de faits. *a)* En particulier de la différence entre milieux naturels et milieux synthétiques. Les premiers contiennent nécessairement beaucoup moins d'impuretés métalliques que les seconds. De plus les milieux naturels sont colloïdaux et les colloïdes doivent jouer

(1) Ce point de vue était déjà celui de MULLER (*loc. cit.*), et il a été soutenu par CHESNEY (1916).

vis-à-vis des ions toxiques un rôle protecteur. Ce rôle protecteur est du reste facilement démontrable par la comparaison de l'effet de faibles quantités de métaux toxiques introduites dans des milieux naturels et des milieux synthétiques. J'ai réalisé cette expérience en cultivant dans des conditions par ailleurs comparables une souche de *B. subtilis*, en milieu synthétique glucosé d'une part, en bouillon de cervelle de veau d'autre part, et, dans les deux cas, en présence de minces lames d'argent introduites dans les fioles de culture. Dans le milieu complexe on obtient simplement une phase de latence prolongée. Dans le second la culture ne se développe pas du tout. b) L'hypothèse d'une action toxique explique également fort bien l'effet considérable de la dilution de l'inoculat, sans avoir recours à l'« allélocatalyse ». Il est évident que la toxicité du milieu sera d'autant plus vite neutralisée que l'inoculat sera plus dense. Il pourra même arriver, avec desensemencements très faibles, que la toxicité du milieu ne puisse être vaincue, et que l'ensemencement reste stérile. En revanche, dans le cas d'ensemencements très larges, la neutralisation pourra être sensiblement immédiate. D'une façon générale, tous les faits sur lesquels se fondaient les hypothèses allélocatalytiques s'expliquent de façon très simple dans l'hypothèse d'une action toxique.

Il est possible que dans certains cas d'autres phénomènes puissent se manifester sous la forme d'une phase de latence mais il paraît certain que, dans la majorité des cas, la phase de latence est sous la dépendance de l'un ou l'autre ou des deux facteurs que nous venons d'énumérer : altérations de la souche consécutives à la croissance elle-même, et toxicité du milieu.

*Indépendance entre la phase de latence
et les autres phases de la croissance.*

Il importe de démontrer que la durée de la phase de latence est sans aucun retentissement sur le reste de la croissance ; en d'autres termes, que les facteurs qui la déterminent sont sans effet sur les autres phases de la croissance.

Lorsque la phase de latence est due aux altérations des cultures souches, il est évident que l'on peut considérer la cause comme disparaissant en même temps que l'effet, et il n'y a aucune raison de penser que dans ce cas la durée de la phase de latence puisse avoir

quelque rapport avec les constantes des autres phases de la croissance. Les deux courbes de la figure 3 en constituent une démonstration expérimentale. A la durée de la phase de latence près, ces deux courbes sont identiques. Elles sont superposables par une

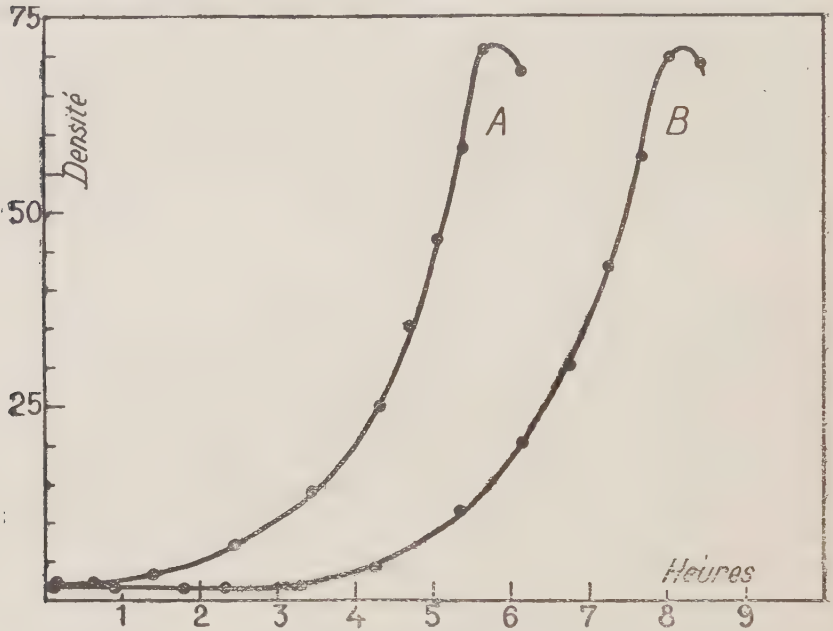


FIG. 3. — Croissance de deux cultures de *B. subtilis* en milieu synthétique. La culture A a été repiquée à partir d'une culture encore en voie de croissance, la culture B à partir d'une culture ayant terminé sa croissance depuis plusieurs heures. A la phase de latence près ces deux courbes sont pratiquement identiques.

simple translation sur l'axe des x . La densité maximum ainsi que le taux de croissance pendant la phase logarithmique pour chacune de ces courbes sont donnés par le tableau suivant :

TABLEAU I.

Courbe	Durée de la phase de latence	Taux de croissance	Maximum (1)
A.....	1 h.	1,25	71,5
B.....	3 h.	1,22	71,0

(1) Pour la signification des unités employées, voir page 30.

Les différences relevées pour le taux de croissance et le maximum sont inférieures aux erreurs d'expérience.

Lorsque l'on doit invoquer, pour expliquer la phase de latence, une action toxique du milieu (c'est-à-dire dans tous les milieux où il sera impossible de supprimer complètement cette phase par repiquage pendant la phase exponentielle, mais où, en revanche, il sera possible de la faire disparaître par des ensemencements très larges), il n'est pas certain, *à priori*, que la toxicité du milieu ne puisse aussi avoir quelque effet sur les autres phases de la croissance. On doit cependant considérer, et presque par définition, que la reprise du taux de croissance constant pendant la phase exponentielle signifie précisément que la toxicité du milieu a été complètement neutralisée. Reste à vérifier que, dans ce cas également, le taux de croissance est indépendant de la durée préalable de la phase de latence. C'est ce que j'ai eu l'occasion de vérifier maintes fois.

Le tableau suivant se rapporte à la croissance de deux cultures de *B. subtilis* en milieu naturel (bouillon de cerveau de veau), dans le premier cas (A) dans des conditions normales, dans le second (B) en présence d'une lame d'argent introduite dans le milieu avant la stérilisation.

TABLEAU II.

Courbe	Phase de latence	Taux de croissance	Maximum
A.....	30'	1,70	43,0
B.....	2 h.	1,67	42,5

A part l'allongement considérable de la phase de latence dans le second cas, les autres caractéristiques de croissance sont identiques, aux erreurs d'expérience près.

En résumé, si la phase de latence paraît pouvoir être l'expression de phénomènes assez divers, on peut lui assigner dans la majorité des cas deux causes essentielles : altération des souches par intoxication ou inanition, toxicité des milieux. Dans les deux cas il n'existe pas de lien nécessaire entre la durée de la phase de latence et les caractéristiques des autres phases de la croissance. Le temps de latence est un phénomène contingent par rapport à la croissance proprement dite. On pourra donc, pour l'étude des autres phases de

la croissance, négliger en général le temps de latence et il n'y a pas d'inconvénient de principe à comparer entre elles des croissances à temps de latence différents.

La phase exponentielle.

Lorsque rien ne s'oppose à leur croissance, que tous les aliments nécessaires sont présents en concentration suffisante, ou plus exactement en excès, la culture croît à taux constant, et la vitesse de la croissance est proportionnelle à la densité de la culture. On sait depuis MALTHUS que dans ce cas la courbe de croissance est une exponentielle. Après n générations la densité x d'une culture ayant crû exponentiellement à partir d'une densité x_0 est

$$x = x_0 2^n$$

ou encore, μ étant le nombre de divisions dans l'unité de temps, x la densité au temps t et x_0 la densité du temps $t = 0$;

$$x = x_0 2^{\mu t}$$

d'où :

$$\mu = \frac{\log x - \log x_0}{t \log 2}$$

équation qui permet de calculer le taux de division connaissant deux valeurs de la densité de la culture, prises dans la phase logarithmique.

Lorsque l'on porte en abscisse les temps, et en ordonnées les logarithmes des densités de la culture, la phase exponentielle s'exprime par une droite, ce qui permet de fixer avec précisions ses limites (V. Fig. 1, courbe B). On a employé au cours de ce travail les logarithmes à base 2 au lieu des logarithmes vulgaires. Les calculs en sont simplifiés, et la simple lecture des graphiques permet de connaître immédiatement le taux de croissance, puisqu'un accroissement d'une unité en ordonnées correspond à un doublement de la densité des cultures.

La phase exponentielle doit jouer un rôle essentiel dans l'étude de la croissance. Lorsqu'une culture croît dans un milieu confiné, celui-ci est profondément modifié. Mais on doit considérer, *par définition*, que ces modifications, tant que dure la phase exponentielle, ont sans effet sur la croissance, puisqu'elles n'en modifient pas le

taux. Par conséquent, si l'on peut établir que, dans un milieu donné, la croissance de telle souche bactérienne se poursuit toujours *exponentiellement* jusqu'à une certaine valeur de la densité, et si l'on peut d'autre part, par une modification quelconque des conditions du milieu, provoquer le ralentissement ou l'arrêt de la croissance *avant cette valeur limite*, on sera en droit de conclure que cette modification est la seule cause du ralentissement de la croissance, et que l'élément modifié joue, en l'occurrence, le rôle de *facteur limitant*. En d'autres termes, la constance du taux de croissance dans les « *conditions témoin* » joue le rôle de test, et l'expérimentation consistera à abaisser par des modifications déterminées des conditions de la culture, ou de la composition du milieu, la valeur limite au delà de laquelle la courbe cesse d'être une exponentielle. C'est sur ce raisonnement que repose la détermination expérimentale des facteurs limitants.

Le taux de croissance.

La valeur du taux de croissance est plus élevée pendant la phase exponentielle qu'à aucun autre moment. Si l'on consent à se représenter schématiquement la croissance comme une synthèse se produisant par une série de réactions en chaîne, le taux de croissance représente alors la vitesse des transformations le long de cette chaîne. Mesurer le taux de croissance, revient à mesurer l'activité du métabolisme de croissance. Cette mesure peut rendre de grands services et dans certains cas remplacer avantageusement la mesure du métabolisme respiratoire. Pendant la phase exponentielle aucun facteur limitant n'est en jeu, et le taux de croissance n'est soumis qu'aux conditions initiales du milieu, variables au gré de l'expérimentateur.

On aura l'occasion de revenir sur les travaux relatifs aux conditions qui déterminent le taux de croissance. Notons qu'ils sont assez peu nombreux, et que des contradictions assez marquées s'y relèvent, certains auteurs pensant que le taux de croissance est dans une très large mesure indépendant de la nature des aliments, d'autres, au contraire, relevant des différences marquées entre milieux de compositions différentes.

Le ralentissement et l'arrêt de la croissance.

Lorsque les circonstances deviennent défavorables, par suite de la croissance même de la culture, le taux de croissance diminue et finit par s'annuler. Les causes qui provoquent le ralentissement et l'arrêt de la croissance ont depuis longtemps sollicité l'attention des chercheurs. Toutes les hypothèses possibles ont été faites. Les principaux types d'explication sont les suivants :

- I) Disparition d'un ou de plusieurs aliments.
- II) Accumulation de déchets toxiques.
- III) Modification des constantes physiques du milieu (pH, pression osmotique).
- IV) Production par les bactéries de toxines spécifiques diffusibles.
- V) Modifications de l'équilibre des aliments.

Mais il est encore une hypothèse, et non des moindres, puisqu'on la trouve sous des formes diverses dans de nombreux travaux, que l'on peut écarter tout de suite. C'est celle d'un « espace minimum » qui serait indispensable à la vie normale des individus.

Il est évident que tous les facteurs que nous venons d'énumérer sont eux-mêmes fonctions de l'espace dont dispose la culture. Si c'est là ce qu'exprime cette théorie, elle a pour elle l'avantage de s'appliquer indistinctement à tous les cas possibles, mais elle a aussi l'inconvénient d'être totalement vague, et inutilisable. Certains, cependant, vont beaucoup plus loin et paraissent penser que l'espace « en soi » peut exercer une action sur les cultures, et limiter le taux de croissance. Nous n'aurions pas à discuter une notion aussi bizarre si elle n'avait été prise au sérieux par nombre d'auteurs. Peut-être, pour faire justice de la notion d'« espace vital », suffit-il de se demander ce qu'il devient dans le cas d'une culture sur gélose, où il est réduit à zéro.

Mise à part cette théorie de l'espace, qu'il vaut mieux ne pas prendre en considération, la plupart des autres explications que nous avons énumérées ont probablement chacune un certain domaine de validité. Ce sont ces domaines qu'il s'agit de préciser. L'étude de la phase de ralentissement pourra alors nous renseigner sur les modifications introduites dans le milieu par la croissance.

Au cours de cet exposé on appellera « croissance totale » et on désignera par la lettre M la quantité :

$$M = x_{\max} - x_0$$

x_0 étant la densité de la culture à l'instant initial, $x_{\max}$ la densité maximum atteinte au cours de la croissance.

La phase de décroissance.

La durée de la phase maximum stationnaire est extrêmement variable, car elle dépend de l'établissement plus ou moins rapide de la phase de décroissance. C'est dans cette phase que l'on se place presque toujours inconsciemment dans la pratique courante de la bactériologie. Une culture de 24 heures, ayant poussé à l'étuve à 37°, a presque toujours déjà dépassé la phase maximum. Il n'est pas indifférent de remarquer que l'immense masse des observations des bactériologistes se rapportent à des cultures ayant cessé de croître. Pour s'en persuader il suffira de se rappeler qu'une culture de *B. coli* par exemple, peut demeurer viable pendant des mois après avoir achevé sa croissance en 4 ou 5 heures.

Pourtant la phase de décroissance, très variable, est extrêmement mal connue quantitativement, et il est impossible d'en donner une interprétation générale simple. Bien plus que pour les autres phases de la croissance, sa définition dépend essentiellement des méthodes de mesures adoptées. Il n'existe pas de critérium certain de mort pour des êtres tels que les bactéries. On ne peut pas dire que, dans une culture qui a cessé d'être repiquable, tous les individus soient « morts ». Une telle culture peut être parfaitement capable de respirer et même d'assimiler. Quand aux tests de coloration, il est difficile de se faire une idée de leur valeur. Les courbes de mort ne sont bien connues que dans le cas où celle-ci est provoquée par un antiseptique. On sait que dans la plupart des cas on a une relation de forme exponentielle, et on démontre que cette relation est en accord avec l'hypothèse suivant laquelle la mort est entraînée par la modification d'une seule molécule (RAHN 1929).

Il est probable que des raisonnements analogues pourraient être appliqués dans le cas où la mort se produit sans l'intervention expérimentale des antiseptiques.

Quoiqu'il en soit ce travail est consacré à l'étude des phases positives de la croissance, et nous n'aurons qu'accessoirement l'occasion de tenir compte de la phase de décroissance. Les problèmes que posent la phrase de décroissance sont d'ailleurs tout différents de ceux que posent les phases de croissance.

Modifications morphologiques au cours de la croissance.

On sait depuis très longtemps que dans les vieilles cultures, sur gélose par exemple, la morphologie des cellules bactériennes est profondément modifiée. Même pendant les quelques heures que dure la croissance d'une culture en milieu liquide, la taille des cellules, sinon les autres caractères morphologiques, se modifie. Ces variations de tailles ont été bien mises en lumière par HENRICI (1923 et suiv.), CLARK et RUEHL (1919), etc.. En général la taille des cellules passe par un maximum à la fin de la phase de latence, demeure constante pendant la phase exponentielle, et diminue par la suite.

Il s'en suit que l'accroissement du nombre d'individus est une mauvaise mesure de l'accroissement réel de la quantité de matière vivante. Dans presque tous les travaux sur la croissance, c'est le nombre d'individus qui a été déterminé, et c'est toujours par le nombre d'individus que s'expriment les résultats. Or, le plus souvent, c'est la quantité de matière vivante qu'il importe de connaître et de mesurer. Le nombre d'individus n'a d'importance que pour les recherches concernant strictement *la division*.

Il résulte de ces variations de taille que le taux d'accroissement n'est pas strictement superposable au taux de division. Il est commode cependant d'assimiler l'un à l'autre, et l'erreur, je l'ai constaté, n'est pas grande, pour les cultures où la phase exponentielle est longue par rapport à la phase de ralentissement, ce qui est le cas pour tous les types de croissance étudiés au cours de ce travail. Aussi a-t-il paru plus simple de ne pas faire de distinction entre taux de croissance et taux de division réel. Les mesures étant exprimées en densité (1), il conviendra cependant de se rappeler que les taux de division qu'on en peut déduire se rapportent à une « bactérie de référence », de dimensions « normales ». Les bactéries réelles sont

(1) C'est-à-dire en quantité de substance vivante par unité de volume.

identiques à la bactérie de référence pendant la phase exponentielle. Elles sont plus petites, et partant plus nombreuses, pendant la phase de ralentissement.

Résumé du chapitre premier.

Au cours de ce chapitre on a exposé les caractéristiques générales de la croissance et sa division en phases successives. On s'est préoccupé en particulier de la phase de latence et de ses rapports avec les autres phases de la croissance. Il se dégage de cet examen que la phase de latence est l'expression d'un phénomène contingent en ce qui concerne la croissance proprement dite, et que les causes dont elle dépend sont en général sans effet sur les autres phases de la croissance.



CHAPITRE II

Méthodes de culture et méthodes de mesure.

I

MÉTHODES DE CULTURE

La presque totalité des auteurs qui ont étudié la croissance des populations bactériennes ont employé les méthodes bactériologiques courantes, à quelques modifications près. Or ces méthodes sont presque toujours inadéquates. Pour l'étude précise de la croissance il est indispensable d'employer des méthodes spéciales, fort simples d'ailleurs et très faciles à mettre en œuvre.

Réglage de la température.

La croissance des bactéries est un phénomène extrêmement rapide, puisque certaines d'entr'elles se divisent toutes les demi-heures ou même toutes les vingt minutes. D'autre part, comme nous le verrons, les coefficients de température des constantes de croissance sont élevés. Il est donc essentiel d'expérimenter dans des conditions de température aussi précises que possible. On doit proscrire l'emploi des étuves couramment employées en bactériologie, et ceci pour plusieurs raisons : 1° Les régulateurs employés sont rarement très sensibles, leur capacité calorifique est élevée, et ils n'agissent qu'avec un retard notable sur les variations de température qui peuvent se produire dans l'enceinte ; 2° Il y a presque toujours des différences considérables de température entre les différents points de l'enceinte (1). L'emploi d'un ventilateur n'y supplée qu'imparfai-

(1) Voir à ce sujet les recherches systématiques de PEDERSON YALE et EGLINTON (1933).

tement, j'ai pu le constater. Celui-ci ne produit que des remous, et pas d'homogénéisation véritable ; 3° Enfin l'ouverture des portes de l'étuve, nécessairement fréquente, provoque des chutes de température considérable qui ne sont rattrapées qu'avec un retard notable.

Pour toutes ces raisons il a paru indispensable d'adopter un thermostat à eau. Toutes les expériences rapportées dans le présent travail ont été faites dans un thermostat du type Warburg. Cet appareil est trop connu pour qu'il soit utile de le décrire. Il suffira de préciser que le thermostat, calorifugé à l'aide d'une épaisseur de molleton, était chauffé électriquement et réglé par un thermomètre à contact sensible au $1/20$ de degré. Les résistances étaient réparties en deux groupes. L'un, indépendant du régulateur, fonctionnait de façon continue. Le courant était réglé de façon que ce groupe, à lui seul, ait une puissance suffisante pour maintenir le thermostat à une température inférieure de deux degrés environ à la température voulue. Le second groupe, commandé par le régulateur, était réglé de façon que les deux groupes ensemble, en fonctionnement continu donnent une température supérieure de deux degrés à la température voulue. On arrive ainsi à réduire au minimum la puissance mise en jeu par le régulateur, et à éviter à peu près complètement les écarts de température qui pourraient provenir de l'inertie du système chauffant. La précision du réglage est alors égale à celle du régulateur lui-même : $1/20$ de degré.

Sauf indication spéciale, toutes les expériences rapportées dans ce travail ont été faites à 37° .

Choix des fioles de culture et renouvellement de l'atmosphère.

Les méthodes de mesures adoptées, et les différents dosages effectués au cours de la croissance, exigent de nombreux prélèvements et entraînent la nécessité d'opérer avec des quantités relativement importantes de milieu : 200 cc. au minimum, lorsque l'expérience ne comporte que des mesures de densité optique, et jusqu'à 500 cc. ou 1 litre, quand ces mesures sont accompagnées de dosages. Les fioles adoptées sont des Erlenmeyer de 1 litre ou 2 litres suivant les quantités de milieu employées.

Le renouvellement suffisamment rapide de l'atmosphère au sein

de la culture est la condition *essentielle* de la détermination de la croissance.

L'aération et le brassage ont été assurés de deux façons suivant les cas :

1° Soit par l'usage d'un dispositif qui agitait continuellement les fioles au sein du thermostat. (Dispositif identique à celui qui est employé pour les manomètres de Warburg).

2° Soit en faisant barbotter de l'air dans le milieu. L'air, issu d'une bombe d'air comprimé, passait à travers une grosse boule en verre remplie de coton stérile et pénétrait dans le flacon par une tubulure terminée par un barboteur en verre poreux d'Iéna, fournissant des bulles extrêmement fines.

Dans la plupart des cas on a employé le premier dispositif, beaucoup plus facile à mettre en œuvre. Le second s'impose cependant quand les quantités de liquide sont importantes. En effet l'agitation mécanique n'est suffisante que lorsque l'épaisseur de la couche liquide dans les flacons ne dépasse pas 8 ou 10 centimètres. Lorsque le flacon est à demi ou aux trois quarts plein il faut recourir à l'aération par barbotage.

Ces précautions ont été souvent négligées. Dans la plupart des cas les recherches sur la croissance ont été faites avec les méthodes courantes de la bactériologie : cultures en tubes à essai, ou en fioles coniques placées à l'étuve et non agitées. Beaucoup d'auteurs paraissent admettre que des cultures en fioles coniques sont suffisamment aérées si l'épaisseur de la couche liquide ne dépasse pas 1 ou 2 centimètres. Or il n'en est rien, comme on pourra s'en convaincre par l'inspection de la figure 20. Il s'agit de deux cultures de *B. coli*, faites toutes deux dans des fioles coniques de 1 litre contenant 200 cc. de milieu. L'épaisseur de la couche liquide dans ces conditions est d'environ 2 centimètres. L'une des cultures était agitée, l'autre immobile, toutes deux au sein du thermostat à 37°. Comme on le voit les deux cultures poussent d'abord de façon identique, après quoi la culture non agitée pousse beaucoup plus lentement, et surtout beaucoup plus irrégulièrement.

Ces irrégularités de croissance doivent être attribuées aux apports irréguliers d'oxygène qui se produisent à la faveur de l'agitation précédant chaque prélèvement. Un simple coup d'œil jeté aux figures publiées par un certain nombre d'auteurs permet de se

rendre compte que beaucoup d'entre eux ont expérimenté dans des conditions d'aération insuffisantes, et explique beaucoup de résultats contradictoires quant à la durée ou même à l'existence de la phase exponentielle (1).

Méthodes d'ensemencement et de prélèvement.

Les mesures et les dosages en cours de croissance exigent des prélèvements fréquents et importants. Il est impossible dans ces conditions d'employer les méthodes classiques de prélèvements stériles (2). Il faudrait pour chaque mesure retirer les fioles du thermostat, ce qui provoquerait des baisses de température, les déboucher, opération aléatoire au point de vue aseptie avec des fioles à gros goulot, flamber de nombreuses fois les mêmes bouchons de coton dont il ne resterait à peu près rien à la fin de l'expérience. Enfin les contaminations ne pourraient manquer d'être fréquentes.

On a donc adopté un modèle de flacon qui permet d'opérer les prélèvements sûrement et rapidement sans avoir à retirer les cultures du thermostat. La fiole de culture est bouchée par un bouchon de caoutchouc à deux trous. Dans l'un d'entre eux plonge un tube court coudé, muni d'une grosse boule remplie de coton. Dans l'autre plonge un tube recourbé à sa partie supérieure. La branche descendante, longue de 20 centimètres environ, est étirée à la flamme. Il est commode de munir le tube à boule d'un tube en caoutchouc à embouchure en verre.

Lorsqu'il s'agit d'une culture aérée par barbotage, le flacon (3) est muni d'une troisième tubulure terminée à l'une de ses extrémités par un barboteur en verre d'Iéna poreux, à l'autre par une boule de verre remplie de coton reliée à l'amenée d'air.

1^o *Stérilisation.* — Pour stériliser ces appareils lorsqu'ils sont

(1) Certains auteurs sont allés jusqu'à nier l'existence de cette phase !

(2) Il a été nécessaire, pour mener à bien ce travail de déterminer les courbes de croissance de près de mille cultures. La croissance de chacune d'entre elles durait de 5 à 12 heures. L'appareillage permettait de suivre simultanément la croissance de trois cultures. Pour obtenir une interpolation précise, les mesures devaient être pratiquées toutes les vingt minutes environ. La construction de chaque courbe de croissance comportait donc la détermination de 10 à 20 points expérimentaux ou plus.

(3) Dans ce cas un ballon à fond rond et à gros goulot.

pleins de liquide, on doit observer quelques précautions car la boule de coton offre une certaine résistance au passage de l'air, et il importe qu'à l'autoclave les différences de pression soient rapidement compensées. On stérilisera donc le tube recourbé ouvert et *ne plongeant pas dans le liquide*, sans quoi on retrouverait les flacons vides. Aussitôt après la stérilisation le tube est enfoncé à fond après avoir été flambé, l'embouchure est scellée à la flamme pour éviter les rentrées d'air pendant le refroidissement.

2° *Ensemencement*. — Après avoir brisé l'extrémité de la pipette, l'avoir séchée et stérilisée à la flamme, on aspire le contenu du tube à ensemer. Lorsqu'il est nécessaire de pratiquer des ensemencements quantitatifs, on utilise des tubes à essai gradués « ad hoc » que l'on vide jusqu'au repère fixé.

3° *Prélèvement*. — Avant chaque prélèvement le tube étiré est longuement flambé. On recueille le liquide directement dans la cuve à faces parallèles servant au dosage, et celle-ci une fois pleine, on laisse le liquide redescendre dans le tube après avoir placé son embouchure dans la flamme d'un bec Bunsen. Après quoi on flambe et on sèche à nouveau la branche descendante.

Cette méthode offre des garanties de stérilité que l'on peut considérer comme absolues. Elle a été d'ailleurs éprouvée par des essais préalables avec des fioles de culture pleines de bouillon stérile. En aucun cas on n'a observé de contamination.

II

MÉTHODES DE MESURE

Avant de justifier la méthode employée au cours de ce travail, il ne sera pas inutile de rappeler les principes des méthodes les plus couramment employées, et d'en faire brièvement la critique.

Les techniques sont innombrables, on le sait (1), mais elles se ramènent à deux principes :

1° Numération des bacilles « vivants » c'est-à-dire capables de se reproduire dans des conditions déterminées.

(1) Il ne saurait être question de les passer ici en revue. On peut consulter à ce sujet l'excellent résumé de FAGUET (1941).

2° Numération directe des corps microbiens.

Quoiqu'elle soit de beaucoup la plus répandue, il y a longtemps que la première de ces deux méthodes aurait dû être abandonnée dans les recherches concernant strictement la *croissance* des cultures bactériennes. Si, en effet, cette méthode permet de se faire une idée de la « vitalité » des cultures, elle ne peut en aucune façon constituer une mesure de leur accroissement réel. Entre le nombre d'individus capables de donner naissance à une colonie sur plaque de gélose et le nombre d'individus présents dans la culture, il n'existe que des rapports indéterminés, qui se modifient au cours de la croissance, et dépendent d'une foule de conditions expérimentales. Aussi est-il absolument impossible de comparer entre eux les résultats donnés par cette méthode avec des souches ou des milieux différents. Enfin l'évaluation qu'elle peut donner de la « vitalité » des cultures est elle-même toute relative. Certains exemples prouvent (V. DAVID, 1932, p. 121) qu'une culture *encore en voie de croissance* peut ne plus contenir, d'après cette méthode, de bacilles « vivants ». Son emploi comme mesure de l'accroissement réel des cultures ne peut conduire qu'à des résultats erronés et à des confusions dont il serait facile de citer de nombreux exemples.

La seconde méthode, numération directe des corps microbiens, est correcte, et c'est du reste la seule possible, dans les recherches concernant la *division*, pour lesquelles il est nécessaire de connaître l'accroissement du *nombre d'individus*. Pourtant, dans les recherches concernant la croissance proprement dite, la variable intéressante n'est pas le nombre d'individus, mais *la quantité de substance vivante*. Or, on le sait, la taille des individus subit des variations très sensibles au cours de la croissance d'une même culture (V. chapitre I, p. 20). A moins qu'il ne soit tenu compte de ces variations, la numération directe ne constitue donc pas une mesure de la croissance. La seule évaluation correcte de la quantité de substance vivante est évidemment le poids de substance sèche. C'est la seule qui ait une valeur absolue suffisamment bien définie, permettant la comparaison des résultats. On ne peut songer malheureusement à employer directement une méthode pondérale. Mais quelle que soit la méthode employée, ses résultats devraient pouvoir s'exprimer sous cette forme. Il est regrettable que ce mode d'expression, si classique qu'il soit, n'ait été que rarement employé dans les recherches concernant la croissance des bactéries.

Au cours de ce travail, les mesures de densité des cultures ont été effectuées à l'aide du néphélémètre de MEUNIER. Il est inutile d'exposer ici la théorie de ce type d'appareil, qui est du reste mal établie. On pourra consulter à ce sujet la revue autorisée de FAGUET (1944). Les justifications théoriques importent peu d'ailleurs. Il suffit d'établir que les indications de l'appareil employé sont effectivement proportionnelles à l'accroissement *réel* des cultures.

On doit donc vérifier :

1^o Que la graduation lue est proportionnelle à la concentration de la suspension bactérienne.

2^o Que le rapport entre les unités arbitraires de l'appareil de mesure, et les unités absolues de référence, c'est-à-dire le poids de substance sèche, ne varie pas sensiblement *au cours de la croissance*.

En ce qui concerne le premier point, la figure 4 montrera que la proportionnalité est en effet respectée dans toute la gamme d'opa-

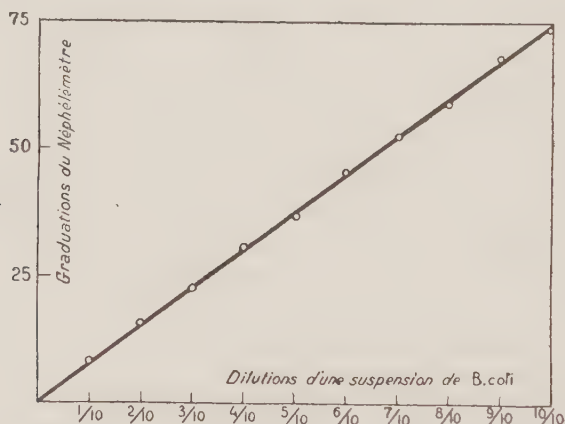


FIG. 4. — Indications de l'appareil de Meunier en fonction de la dilution d'une suspension de *B. coli*. Mesures effectuées en lumière bleue.

cité mesurable. Ce graphique exprime en ordonnées la graduation de l'appareil, en abscisses les dilutions (de 1/10 à 10/10) d'une suspension de *B. coli* dans un milieu synthétique. On voit que les points expérimentaux s'alignent avec précision sur une droite, passant par l'origine des coordonnées.

La mesure est donc correcte lorsqu'on ne considère que les différentes dilutions d'une même suspension. Il reste à savoir si elle l'est également lorsque l'on compare des cultures d'âges différents. On

pourrait craindre en effet que les variations de taille des bactéries au cours de la croissance n'entraînent des variations du rapport des unités arbitraires aux unités pondérales.

En pratique, les seules variations qu'il importe pour nous de considérer sont celles qui pourraient se produire entre les deux phases les plus importantes de la croissance : phase exponentielle et maximum. Les contrôles ont été effectués par la technique suivante : Les cultures sont faites en milieu synthétique *S* additionné de 200 mg. par litre de glucose (dans le cas de *B. coli*) ou de saccharose (dans le cas de *B. subtilis*). Dans ces conditions, le maximum atteint par les cultures correspondait à 60 unités de densité optique environ, et la phase exponentielle se prolongeait jusque vers 50 unités de densité. 50 cc. de culture étaient prélevés lorsque la densité atteinte était d'environ 35 unités, et 50 autres cc. au moment du maximum. La densité optique était déterminée par ailleurs au moment de chaque prélèvement. Après avoir ajouté quelques gouttes de formol, chaque prélèvement de 50 cc. était centrifugé très énergiquement (9.000 tours pendant 10 minutes). Après décantation, le culot était remis en suspension dans de l'eau distillée, et centrifugé une seconde fois. Après décantation les tubes, préalablement tarés, étaient placés dans l'étuve à 100 et desséchés à poids constant. Les pesées étaient effectuées sur une balance sensible au 1/10 de milligramme.

Le tableau III résume 16 déterminations effectuées avec 4 cultures de *B. coli*. Le tableau IV, 16 déterminations effectuées avec 4 cultures de *B. subtilis*.

TABLEAU III.

*Correspondance des unités pondérales
et des unités de densité optique (B. coli).*

	Lecture du néphélémètre	Poids de substance sèche dans 50 cc. de milieu (milligrammes)	Poids de substance sèche en milligrammes par litre de milieu pour 10 unités optiques	
Prélèvement pendant la phase exponen- tielle	32,9	1,3	7,9	} moyenne = 7,9
	38,6	1,5	7,7	
	41,5	1,7	8,2	
	30,4	1,2	7,9	
Prélèvement au mo- ment du maximum.	62,2	2,5	8,0	} moyenne = 8,0
	62,4	2,6	8,3	
	62,0	2,4	7,7	
	62,6	2,5	8,0	

TABLEAU IV.
Correspondance des unités pondérales
et des unités de densité optique (*B. subtilis*).

	Lecture du néphélomètre	Poids de substance sèche dans 50 cc. de milieu (milligrammes)	Poids de substance sèche en milligrammes par litre pour 10 unités optiques	
Prélèvement pendant la phase exponen- tielle	31,0	1,2	7,7	} moyenne = 7,6
	34,6	1,3	7,5	
	40,0	1,6	8,0	
	35,2	1,3	7,4	
Prélèvement au mo- ment du maximum.	57,5	2,1	7,3	} moyenne = 7,5
	56,5	2,2	7,8	
	57,0	2,2	7,4	
	56,8	2,1	7,4	

Comme on le voit, les écarts entre les diverses déterminations atteignent 10 %, et il paraît difficile de rendre ces contrôles plus précis, étant donné les faibles quantités de matière récoltées. Cependant on doit noter que l'on n'observe aucune tendance à une augmentation ou à une diminution du rapport des unités quand on passe de la phase exponentielle au maximum. D'autre part, à la précision près de ces mesures, le rapport est pratiquement le même pour *B. coli* et *B. subtilis*, deux bactéries de tailles très différentes. Il est clair, par conséquent, que les variations de taille des bactéries au cours de la croissance ne peuvent entraîner une variation notable de la valeur absolue des unités de densité optique. Déjà en 1921, VLES avait indiqué que la variable importante en opacimétrie bactérienne n'était pas la taille ou le nombre des corps bactériens, mais la taille multipliée par le nombre, c'est-à-dire en définitive la quantité de substance vivante. LOOFBOUROW et DWYER (1938) ont obtenu des résultats semblables avec des suspensions de levures.

La grande majorité des résultats expérimentaux exposés dans ce travail seront exprimés en unités de densité optique, les valeurs relatives étant seules à considérer. Lorsque la transformation en unités pondérales sera nécessaire, le rapport de transformation sera uniformément arrondi à 0,8 pour *B. subtilis* comme pour *B. coli*. De toutes façons, comme nous venons de le voir, ce rapport n'est défini qu'à 10 % près.

Dans le cas où il sera nécessaire d'établir des comparaisons *pondérales* entre cultures différentes, il sera préférable de ne comparer entre elles que des cultures se trouvant dans le même état physiologique, c'est-à-dire à la même phase de la croissance. Tel est bien le cas, en particulier, pour les mesures de rendement, pour lesquelles la transformation en unités pondérales est indispensable.

Précision des mesures. — L'erreur absolue dans la détermination de la densité optique ne dépasse pas 0,2 divisions de l'appareil de mesures, lorsqu'on se place dans les meilleures conditions. Cependant lorsqu'on a de très nombreuses mesures à effectuer, pour suivre par exemple la croissance simultanée de plusieurs cultures, il est difficile de réaliser les meilleures conditions possibles. L'erreur absolue est alors plus élevée. On peut admettre cependant qu'elle ne dépasse pas 0,5 unités.

III

MILIEUX ET SOUCHES

La méthode de mesure adoptée impose certaines conditions pour le choix des milieux de culture : ceux-ci doivent être aussi limpides que possible et ne pas se troubler ou précipiter au cours de la croissance des cultures.

1° *Milieux naturels.* — On a utilisé exclusivement le bouillon de cervelle de veau, ou de mouton, qui présente l'avantage d'être presque incolore. De plus, la composition de la matière cérébrale étant très stable, on arrive facilement à obtenir des préparations de qualités nutritives quantitativement comparables. La cervelle, coupée en morceaux et soigneusement débarrassée de toutes traces sanglantes, est additionnée de deux fois son poids d'eau distillée. On décante et on filtre après un séjour d'une demi-heure à l'autoclave à 100° et refroidissement. Ce bouillon constitue une solution mère qui est conservée à la glacière et diluée avec de l'eau distillée dans les proportions nécessaires pour chaque expérience. Les dilutions utilisées en pratique allaient de 1/100^e à 1/10^e. Il est inutile d'ajuster le *pH* qui est voisin de la neutralité.

2° *Milieux synthétiques.* — Les milieux synthétiques usuels pré-

sentent souvent l'inconvénient de précipiter très facilement, sinon dès leur préparation, au moins durant la stérilisation ou pendant la croissance des cultures. Pour ce travail on a adopté la « constante saline » suivante qui sera dorénavant désignée sous le nom de « Milieu S » :

PO^4KH^2	2
NH^4Cl	0,5
SO^4Mg	0,03
SO^4Fe	0,005
$CaCl^2$	0,01
Eau redistillée sur Pyrex	1000

Les sels sont dissous dans 900 cc. d'eau environ et le pH est ajusté à $7,0 \pm 0,1$ par addition d'une solution de soude normale (environ 9 cc.), après quoi on complète à 1 litre. Le milieu est alors passé à l'autoclave à 100 degrés pendant 1/4 d'heure, refroidi et filtré, car il s'y produit un très léger louche. Enfin le pH est vérifié à nouveau. On obtient ainsi une solution extrêmement stable, qu'aucune stérilisation ultérieure ne modifie. Le milieu est réparti dans les fioles d'expérience (200 cc. par fiole en général) qui sont stérilisées pendant 1/4 d'heure à 130°. Le glucide, constituant la source carbonée, dont la nature et la concentration varient suivant les expériences, est stérilisé à part dans de petits tubes à hémolyse contenant 2 cc. d'eau redistillée. Le contenu de ces tubes est aspiré stérilement dans les fioles d'expérience avant l'ensemencement.

Ce milieu ne se trouble jamais au cours de la croissance. D'autre part de très nombreuses vérifications ont prouvé qu'il est suffisamment tamponné pour que les variations de pH n'influent pas sur la croissance, tout au moins lorsqu'on ne dépasse pas les concentrations de sucre utilisées au cours de ce travail (au maximum 500 mg. par litre). Dans ces conditions, le pH , à la fin de la croissance, ne dépasse jamais 6,4 du côté acide. Or la croissance des cultures de *B. subtilis* et *B. coli* n'est affectée qu'à partir de pH 5,5 environ.

Souches.

On a utilisé au cours de ce travail une souche de *B. subtilis* et une souche de *B. coli*, toutes deux issues des collections de l'Institut Pasteur, et que je dois à l'extrême obligeance de M. LEGROUX, chef de service à l'Institut Pasteur. La souche de Bacille subtil est dési-

gnée sous le nom de « Subtilis Caron », la souche de colibacille sous le nom de « Coli H ». Elles ont été conservées sur gélose ordinaire, à l'obscurité. L'ensemencement des fioles d'expérience était toujours pratiqué à partir de cultures en milieu liquide ayant subi au préalable plusieurs passages sur le milieu expérimenté.



CHAPITRE III

Le rendement en fonction de la concentration de l'aliment et de la nature de la source ternaire.

I

INTRODUCTION

Parmi les nombreux facteurs capables, en théorie, de limiter la croissance des cultures, il en est deux qui, au premier abord, paraissent devoir être les plus importants :

1° L'épuisement du milieu en un ou plusieurs aliments.

2° L'accumulation de déchets métaboliques ou de toxines spécifiques.

Le rôle relatif de ces deux facteurs a donné lieu à des travaux et à des discussions très nombreux. L'intérêt des chercheurs, cependant, a été principalement centré sur la question des toxines spécifiques, dont on pouvait espérer des applications en pathologie. La plupart des auteurs se sont efforcés de démontrer leur existence, ou au contraire de nier leur importance comme facteurs limitants. EIJKMANN (1904) fut l'un des premiers à étudier cette question. Il conclut d'expériences faites principalement sur milieux solidifiés, que les bactéries secrètent des substances empêchantes, thermolabiles, non filtrables. RAHN (1906), CHESNEY (1916), BESREDKA (1923) et ses élèves ont soutenu des points de vue analogues, ainsi que WOODRUFF (1911, 1913) qui expérimentait avec des cultures de Ciliés.

Le rôle de ces toxines dans la croissance, et leur existence même, ont été d'autre part souvent niés ou mis en doute (BROOM 1921, BARNES 1931) et la question, somme toute, demeure en suspens.

Les expériences exposées dans le présent chapitre apporteront quelques éléments à ce problème, mais ce n'est pas là leur but principal. On étudiera ici la « croissance totale » des cultures en fonction de la concentration des aliments, et *en l'absence de tout autre facteur limitant*, ce qui revient, nous le verrons, à évaluer le *rendement de la croissance*. Il s'agit tout d'abord de démontrer qu'une telle expérience est possible, et que l'effet des autres facteurs limitants peut être complètement annulé.

Il est évident que l'action relative des toxines (ou des déchets éventuellement toxiques) et de l'épuisement des aliments dépend essentiellement de la densité de la culture. En faisant varier entre de larges limites la concentration initiale des aliments, on devra obtenir des populations dont les densités maximales seront très différentes. Le rôle de l'accumulation des toxines dans l'évolution de la culture doit être d'autant moindre que cette densité maximum est plus faible. Au-dessous d'une certaine limite leur effet doit être pratiquement nul, alors que dans des milieux très riches on peut penser qu'il deviendra prépondérant. Restent à déterminer les limites de concentration entre lesquelles le rôle des toxines est nul, et à savoir si elles sont suffisamment larges pour que l'expérimentation soit possible. Deux criteriums pourront nous guider.

1° Si, dans un milieu donné, la croissance d'une souche donnée peut se poursuivre *exponentiellement* jusqu'à une certaine limite, on peut être certain que, jusqu'à cette limite au moins (et même si l'on ignore quel est le facteur qui l'impose), le rôle des toxines et des déchets est nul, puisque le taux de croissance est constant. Il suffira alors de diluer le milieu jusqu'à ce qu'on obtienne une croissance totale inférieure à la limite en question. Pour toutes les dilutions inférieures à la limite, on est en droit d'affirmer que seule la dilution des aliments limite la croissance.

2° Il doit exister entre la concentration de l'aliment et la croissance totale (1) une relation simple. Celle-ci cessera d'être manifeste lorsque d'autres facteurs limitants seront en jeu. Ce second critère doit indiquer une limite plus élevée que le premier. Il est vraisemblable, en effet, qu'avant de devenir un *facteur d'arrêt*, l'accumula-

(1) Rappelons que par cette expression on entend la quantité $M = x_{\max} - x_0$ c'est-à-dire la différence entre la densité maximum et la densité initiale.

tion des toxines peut jouer un rôle simplement ralentisseur. Il sera préférable d'expérimenter à l'intérieur des limites imposées par le premier criterium. Sa valeur dépendra de la précision avec laquelle la croissance suivra une loi exponentielle. Nous verrons que cette condition est remarquablement réalisée par les cultures bactériennes.

* * *

On ne possède jusqu'à présent qu'un très petit nombre de données quantitatives sur le problème qui nous préoccupe ; celui de la croissance en fonction de la concentration de l'aliment. La plupart des opposants à l'hypothèse des autotoxines se sont contentés d'indiquer que dans leurs expériences l'arrêt de la croissance était, ou pouvait être, imposé par l'appauvrissement du milieu.

La mise en évidence d'une relation simple entre la concentration de l'aliment et la croissance totale offre cependant un grand intérêt, à plusieurs points de vue :

1° C'est la condition préalable de toute recherche sur le rendement des synthèses en fonction de la *nature* des aliments. Or c'est là un problème à peu près ignoré de la physiologie bactérienne.

2° De la nature de cette relation il doit être possible de tirer des conclusions sur l'énergétique de la croissance, en particulier sur l'importance relative de la ration d'entretien et de la ration de croissance, et sur les modifications possibles de l'équilibre des réactions de synthèse avec la concentration des substrats.

3° Ces expériences pourront apporter des éléments quantitatifs au problème de l'importance relative des toxines et des aliments dans la limitation de la croissance. Elles indiqueront en tous cas la limite de densité au dessous de laquelle le rôle des toxines, si elles existent, est certainement nul.

La première section de ce chapitre sera donc consacrée à l'étude de la croissance totale en fonction de la concentration initiale des aliments. Dans la seconde on réunira un certain nombre de données concernant le rendement matériel de la croissance de trois espèces bactériennes (*B. coli*, *B. subtilis*, *B. typhi-murium*) aux dépens de différentes sources carbonées.

II

LE RENDEMENT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES ALIMENTS

Résultats expérimentaux.

Afin de donner aux conclusions une portée générale il convenait d'expérimenter avec des milieux variés et plusieurs souches différentes. J'ai utilisé une souche de *B. coli*, une souche de *B. subtilis*, et plusieurs milieux naturels et synthétiques. Dans la plupart des cas les courbes de croissance ont été suivies depuis leur début jusqu'au delà du maximum. Les mesures, cependant, ont été plus espacées au début qu'à la fin des expériences, puisque, pour la détermination du maximum, seuls les derniers chiffres sont importants. La croissance totale est calculée par différence entre le premier chiffre et le chiffre le plus élevé.

Expériences en milieux complexes.

Les expériences ont porté sur *B. subtilis* et *B. coli*. Les techniques ont été suffisamment décrites au chapitre II. Il n'y a rien à y ajouter. Le maximum est stable, et par conséquent particulièrement bien défini.

Le tableau V et la figure 5 expriment les résultats d'une série d'expériences avec *B. coli* sur différentes dilutions d'un même bouillon de cervelle de veau. La concentration 1 correspond à une macération de 1.000 gr. de cervelle dans 1.000 cc. d'eau, diluée 100 fois. Le « rendement » est donné par le rapport :

$$\frac{\text{Croissance totale}}{\text{Concentration du milieu}}$$

Il s'agit par conséquent d'un « rendement » relatif, calculé à partir d'unités arbitraires, dont le rapport avec les unités pondérales n'est pas déterminé.

Le quotient de la somme des nombres de la deuxième colonne par la somme des nombres de la première donne le « rendement moyen ».

TABLEAU V.

*Croissance totale et rendement des cultures de B. coli
sur bouillon de cervelle de veau,
en fonction de la concentration du milieu.*

Concentration du milieu	Croissance totale	Rendement	Ecart par rapport à la moyenne
0,5	4,5	9,0	+ 5,1 %
1,0	7,0	7,0	— 18,2 %
1,0	8,0	8,0	— 6,5 %
1,5	12,0	8,0	— 6,5 %
1,5	13,0	8,7	+ 1,6 %
2,0	16,0	8,0	— 6,5 %
2,5	21,0	8,4	— 1,9 %
3,0	26,5	8,8	+ 2,8 %
4,0	33,0	8,3	— 3,0 %
5,0	43,5	8,7	+ 1,6 %
6,0	53,0	8,8	+ 2,8 %
7,0	61,0	8,7	+ 1,6 %
8,0	69,0	8,6	+ 0,5 %
9,0	78,5	8,7	+ 1,6 %
10,0	85,0	8,5	— 0,7 %

Rendement moyen 8,56

On voit que le rendement est remarquablement constant, puisque,

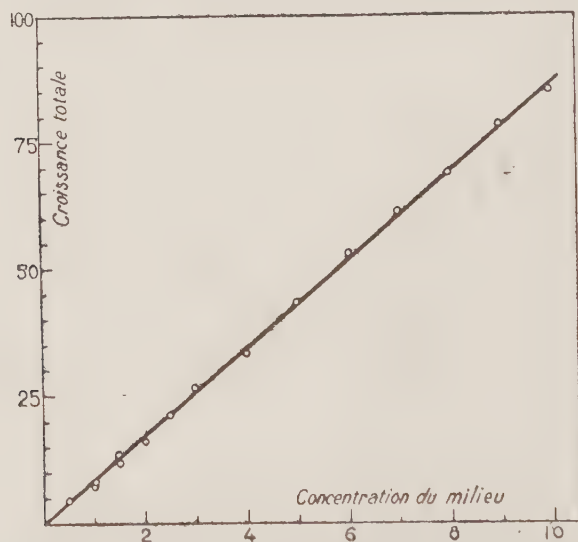


FIG. 5. — Croissance totale des cultures de *B. coli* en bouillon de cervelle de veau, en fonction de la concentration du milieu. Unités arbitraires.

si l'on ne tient pas compte des écarts se rapportant aux concentrations les plus faibles (jusqu'à 2), la relation linéaire entre la concen-

tration initiale et la croissance totale est vérifiée à moins de 3 % près. C'est là un degré de précision dont on se contenterait en général s'il s'agissait d'un dosage microchimique. La droite représentative passe sensiblement par l'origine des coordonnées. Ces résultats montrent très suffisamment que seule la concentration du milieu limite la croissance. Cependant je n'ai pu obtenir que le second critère corrobore celui-ci. En effet, même avec des concentrations élevées de bouillon, la phase exponentielle de la croissance de cette souche sur tous les milieux complexes essayés est extrêmement courte, la phase ralentie au contraire beaucoup plus longue. Nous verrons qu'il n'en est plus ainsi sur les milieux synthétiques. L'explication de ce phénomène relève probablement des mêmes hypothèses que les phénomènes de diauxie, décrits dans la dernière partie de ce travail. Pour l'instant, la constance du rendement est une preuve suffisante que d'autres facteurs ne contribuent pas sensiblement à la limitation de la croissance.

Le tableau VI et la figure 6 se rapportent à une souche de *B. subtilis* sur bouillon de cervelle de mouton. La concentration 1 correspond à une macération à 500 p. 1.000 diluée 100 fois. Le rendement est exprimé comme dans l'expérience précédente.

TABLEAU VI.

Croissance totale et rendement des cultures de *B. subtilis* sur bouillon de cervelle de veau, en fonction de la concentration du milieu.

Concentration du milieu	Croissance totale	Rendement	Ecart par rapport à la moyenne
1	5,0	5,0	— 18 %
2	12,0	6,0	+ 1,7 %
4	23,5	5,9	0,0 %
6	37,0	6,2	+ 5 %
10	61,0	6,1	+ 3,4 %
14	81	5,8	— 1,7 %
20	115	5,8	— 1,7 %

Rendement moyen : 5,9.

On voit que les résultats sont identiques aux précédents. Cependant ils sont moins précis que dans le cas de *B. coli*, les écarts par rapport à la moyenne sont plus importants. La variabilité des maxima observés avec cette souche s'est du reste toujours montrée plus élevée qu'avec *B. coli*.

La phase exponentielle de la culture correspondant à la concentration la plus élevée dans l'expérience précédente (concentration 20) s'est prolongée jusqu'à la densité 80 (64 mg. sec par litre). Il est difficile, quelle que soit la concentration du milieu, de prolonger plus loin la croissance à taux constant. Il est donc probable qu'un autre facteur limitant s'introduit à partir de cette densité. Quoique je n'aie pas réalisé d'expériences destinées à identifier ce facteur, il

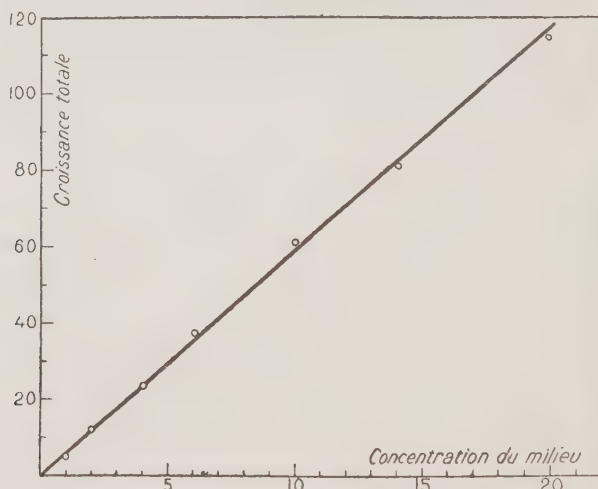


FIG. 6. — Croissance totale des cultures de *B. subtilis* en bouillon de cervelle de mouton, en fonction de la concentration du bouillon. Unités arbitraires.

paraît très probable que ce ralentissement est dû à une diffusion trop lente de l'oxygène dans le milieu, malgré l'agitation des fioles de culture. La relation linéaire entre la concentration du milieu et la croissance totale continue en effet de se vérifier au delà de cette limite. Il ne peut donc s'agir d'un facteur *limitant* proprement dit mais d'un «facteur de ralentissement». Quoi qu'il en soit, il est certain qu'au-dessous de la densité 80 *seul* l'appauvrissement du milieu limite le taux de la croissance.

Détermination de la source alimentaire jouant le rôle limitant.

Dans les expériences qui viennent d'être décrites, on a considéré les aliments dans leur ensemble. Les expériences ont consisté à diluer un milieu complexe. Il est vraisemblable qu'au cours de la

croissance l'une des sources alimentaires nécessaires à la vie des organismes disparaît avant les autres, et joue à elle seule le rôle de facteur limitant, les autres aliments se trouvant encore en excès alors que celui-là a disparu. Il est important, au point de vue pratique comme au point de vue théorique, de savoir quelle source alimentaire joue ce rôle. Il importe surtout de savoir s'il s'agit d'un aliment fournisseur d'énergie (source carbonée) ou non (source azotée ou phosphatée par exemple).

On peut montrer facilement qu'il s'agit de la source carbonée. En effet, si à une culture de *B. coli* ayant achevé sa croissance sur bouillon de cervelle de veau, on ajoute du glucose en concentration suffisante, la croissance reprend aussitôt, alors que l'addition d'une source azotée (NH^4Cl) ou phosphatée (PO^4KII^2) ou de tout autre élément minéral ne produit aucun effet.

Expériences en milieux synthétiques.

On voit donc que, dans les milieux complexes utilisés, la limite de croissance est en fait imposée par la disparition d'un seul aliment, ou du moins du groupe de substances constituant la source carbonée. Les expériences suivantes ont été faites dans un milieu synthétique dont tous les constituants minéraux sont demeurés constants et où seule variait la concentration de l'unique source carbonée.

a) *B. coli*. — Pour la préparation des milieux v. p. 31. Les deux tableaux suivants résument la croissance de la souche sur deux glucides, dont un hexose (glucose) et un hexite (mannite). Les concentrations sont indiquées en milligrammes par litre. La croissance totale est donnée en unités néphélométriques (colonne 2) et en milligrammes de substance sèche par litre (colonne 3).

Le rendement est exprimé en :

$$\frac{\text{milligrammes de poids sec par litre}}{\text{concentration du glucide en mg. par litre}}$$

TABLEAU VII.

**Croissance totale et rendement des cultures de *B. coli*
sur milieu S + glucose,
en fonction de la concentration du glucose.**

Concentration de glucose (mg. par litre)	Croissance totale (unités de densité)	Croissance totale (mg. sec par litre)	Rendement	Ecart par rapport à la moyenne
200	58,7	47,0	0,235	+ 0,9 %
180	53,0	42,4	0,236	+ 1,3 %
160	46,8	37,4	0,234	+ 0,43 %
140	44,3	33,0	0,236	+ 1,3 %
120	35,0	28,0	0,234	+ 0,43 %
90	26,0	20,8	0,230	— 1,3 %
70	20,0	16,0	0,228	— 2,1 %
50	14,4	11,5	0,230	— 1,3 %
25	6,7	5,4	0,258	+ 10,7 %

Rendement moyen = 0,233.

TABLEAU VIII.

**Croissance totale et rendement des cultures de *B. coli*
sur milieu S + mannite,
en fonction de la concentration en mannite.**

Concentration de la mannite (mg. par litre)	Croissance totale (unités de densité)	Croissance totale (mg. sec par litre)	Rendement	Ecart par rapport à la moyenne
200	63,0	50,4	0,250	— 2,0 %
160	51,8	41,5	0,259	+ 1,6 %
140	44,6	35,7	0,255	0,0 %
120	38,5	30,8	0,250	— 2,0 %
100	31,5	25,2	0,252	— 1,2 %
80	26,0	20,4	0,255	0,0 %
60	20,0	16,0	0,266	+ 4,3 %
40	12,7	10,2	0,255	0,0 %
20	6,6	5,3	0,265	+ 3,9 %

Rendement moyen = 0,255.

b) *B. subtilis*. — Le tableau suivant se rapporte à la croissance d'une culture de *B. subtilis* sur milieu S additionné de concentrations variables de saccharose. Alors que le maximum est bien défini dans les cultures de *B. coli* sur milieu synthétique, il l'est beaucoup moins bien dans les cultures de *B. subtilis* sur le même milieu. Il n'y a pas de « phase maximum stationnaire ». Aussitôt la croissance achevée, la culture se lyse, et à un taux extraordinairement

rapide. Aussi, pour obtenir une définition suffisante du maximum, est-il nécessaire de pratiquer des mesures extrêmement rapprochées (toutes les 10 minutes environ) et encore ne peut-on espérer obtenir des résultats aussi précis qu'avec les cultures de *B. coli*.

TABLEAU IX.

*Croissance totale et rendement des cultures de B. subtilis
sur milieu S + saccharose,
en fonction de la concentration en saccharose.*

Concentration (mg. par litre)	Croissance totale (un té de densité)	Croissance totale (mg. sec par litre)	Rendement	Ecart par rapport à la moyenne
300	82,5	61,0	0,203	— 6,9 %
250	68,0	54,4	0,218	0,0 %
200	56,5	45,2	0,225	+ 3,2 %
150	38,3	30,6	0,204	— 6,4 %
100	26,2	21,0	0,210	— 3,7 %
50	15,5	12,4	0,248	+ 13,7 %
25	8,0	6,4	0,256	+ 17,4 %

Rendement moyen = 0,218

L'examen de ces trois tableaux et des figures 7, 8 et 9 qui en objectivent les résultats montre que la croissance totale de toutes ces

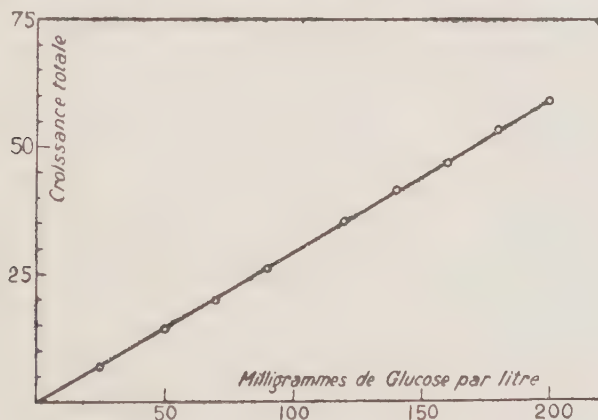


FIG. 7. — Croissance totale des cultures de *B. coli* en milieu synthétique en fonction de la concentration du milieu en glucose.

cultures est directement proportionnelle à la concentration initiale du sucre dans le milieu. Le rendement est remarquablement cons-

tant, et quoique les résultats soient relativement moins précis pour

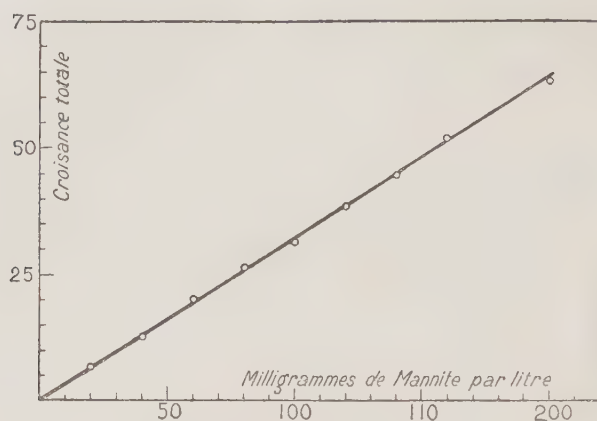


FIG. 8. — Croissance totale des cultures de *B. coli* en milieu synthétique en fonction de la concentration du milieu en mannite.

les faibles concentrations, on n'y discerne aucune tendance à une augmentation ou à une diminution du rendement.

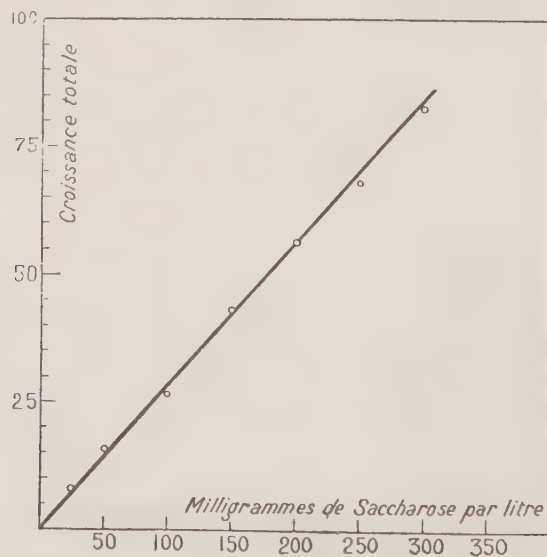


FIG. 9. — Croissance totale des cultures de *B. subtilis* en milieu synthétique en fonction de la concentration du milieu en saccharose.

Les figures 10 et 11 montreront d'autre part que la croissance des deux souches expérimentées peut, à la seule condition que le

milieu soit assez riche, se poursuivre exponentiellement, à taux constant, bien au delà des limites de densité atteintes dans les expériences résumées par les tableaux VII, VIII et IX. Ces deux figures expriment, en coordonnées semi-logarithmiques, la phase exponentielle de la croissance d'une culture de *B. coli* (fig. 10) et d'une culture de *B. subtilis* (fig. 11) en milieu synthétique. La phase exponen-

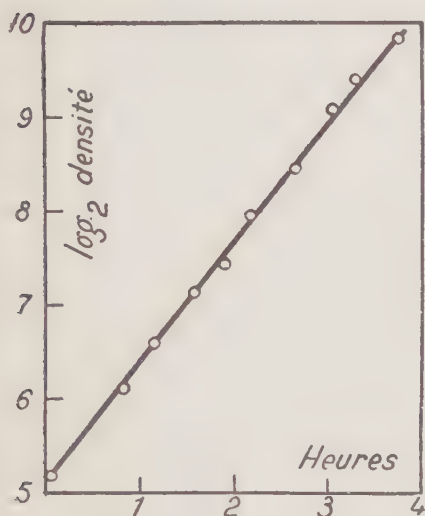


FIG. 10. — Phase exponentielle de la croissance d'une culture de *B. coli* en milieu synthétique, avec 300 mgr. par l. de glucose. Coordonnées semi-logarithmiques.

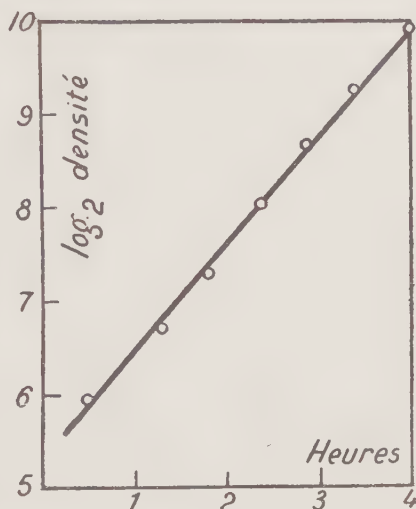


FIG. 11. — Phase exponentielle de la croissance d'une culture de *B. subtilis* en milieu synthétique, avec 500 mgr. par l. de saccharose. Coordonnées semi-logarithmiques.

tielle de la culture de *B. coli* se prolonge jusqu'à la densité 90 (72 mgr. de poids sec par litre) le milieu contenant 300 mg. par litre de glucose. Pour *B. subtilis* le milieu contenait 500 mg. de saccharose par litre, et la croissance à taux constant se prolonge au delà de la concentration 100 (80 mgr. sec par litre). Il est donc certain que, jusqu'à ces limites au moins, aucune condition limitante ne se manifeste de manière sensible. Ces limites elles-mêmes n'étant pas atteintes dans les expériences résumées par les tableaux VII, VIII et IX, on peut donc admettre que dans ces expériences, la croissance est *uniquement* limitée par l'appauvrissement du milieu en un aliment : la source carbonée. L'influence des toxines ou des déchets toxiques n'est pas sensible, et les autres aliments sont en

quantité suffisante pour que leur disparition n'exerce aucune influence sur la croissance.

Discussion des résultats.

Le Rendement.

L'ensemble des résultats entièrement concordants que l'on vient de passer en revue, démontre que le *rendement de la croissance est indépendant de la dilution de l'aliment limitant*. Cette constatation entraîne un certain nombre de conclusions. Certaines d'entre elles, concernant l'énergétique de l'utilisation des aliments, ne pourront être utilement discutées que lors que nous serons en possession de données dont l'exposé a été réservé pour le chapitre V.

Il est un point cependant qui doit dès maintenant attirer notre attention. Un simple coup d'œil aux graphiques exprimant la croissance totale en fonction de la concentration des aliments montre que la droite représentative passe toujours très sensiblement par l'origine des coordonnées. C'est là un fait surprenant et qui mérite d'être examiné avec quelque attention. Il est en effet raisonnable de supposer que, pour toute source alimentaire essentielle, mais surtout pour la source hydrocarbonée, fournisseuse d'énergie, il existe un seuil de concentration au-dessous duquel la croissance est impossible. La concentration-limite, permettant la subsistance, mais ne permettant pas la croissance, pourrait être appelée « concentration d'entretien ». Cette hypothèse, *a priori* très vraisemblable, n'est pas en contradiction avec le fait que la relation croissance totale-concentration de l'aliment est linéaire. Celle-ci peut être représentée par l'équation :

$$M = K (C - C_o) \quad (1)$$

M étant la croissance totale, K le rendement, C la concentration de l'aliment, et C_o représentant la « concentration d'entretien ». Graphiquement, C_o est le point de rencontre de la droite représentative avec l'abscisse. Or, si les graphiques expérimentaux expriment correctement le phénomène, C_o est nul. On doit en conclure que toute concentration, si petite soit-elle, d'aliment et en particulier d'aliment énergétique, non seulement suffit à l'existence des organismes mais encore à leur croissance.

Cette conclusion est assez surprenante pour qu'il soit nécessaire de déterminer avec précision dans quelle mesure elle est imposée par les données expérimentales. Nous n'avons considéré jusqu'ici que l'expression graphique des résultats. Le calcul pourra peut-être nous donner des indications plus précises. Notons tout d'abord que le calcul du rendement a été fait simplement en prenant le quotient de la croissance totale par la concentration initiale de l'aliment. La constance du chiffre trouvé indique que C_0 est nul ou négligeable.

Il convient cependant de rechercher le maximum de précision dans l'évaluation de C_0 . Le tableau ci-dessous donne les valeurs trouvées pour C_0 dans l'équation (1), calculées par la méthode des moindres carrés, d'après les chiffres des expériences correspondant aux tableaux VII, VIII et IX.

TABLEAU X.

Expérience	Concentration d'entretien (mg. par litre)
Coli sur Glucose.....	+ 2,27
Coli sur Mannite.....	— 1,52
Subtilis sur Saccharose.....	— 1,90

On voit que les valeurs trouvées sont infimes, ou parfois même négatives. On est donc obligé de conclure que la concentration d'entretien, si elle existe, est assez petite pour échapper complètement à l'expérience.

Certes ces conclusions sont basées sur une extrapolation, mais une extrapolation qui comporte le maximum de sécurité, étant donné la précision des chiffres. L'extrapolation n'est légitime, il est vrai, que dans la mesure où la relation entre la concentration initiale du milieu en sucre et la croissance totale continue d'être linéaire, même au voisinage de zéro. Les résultats expérimentaux paraissent bien indiquer qu'il en est ainsi, et il n'y a aucune raison de faire l'hypothèse contraire. On peut en tous cas conclure que, *entre les limites de concentration étudiées* (et elles sont assez larges), *tout se passe comme si la concentration d'entretien était nulle.*

Les seules données que l'on puisse relever dans la littérature sur le sujet qui nous préoccupe sont celles de FRIEDLEIN (1931). Cet

auteur pense que, de ses expériences, on peut conclure que la plus petite concentration de glucose permettant la croissance des cultures de *B. Coli* est comprise entre 16 et 1,6 milligrammes par litre. Il y a donc en apparence une différence considérable entre ses résultats et les nôtres. En réalité FRIEDLEIN a simplement recherché quelle était la plus petite concentration permettant *l'entretien des cultures et leurs repiquages*. Ses résultats prouvent simplement que cette méthode ne peut être employée pour la détermination de la « concentration d'entretien ».

Nous aurons l'occasion à la fin du chapitre V (p. 95) de revenir sur ce point et sur l'interprétation qui peut être donnée de ces faits. Notons cependant dès maintenant que l'interprétation la plus directe de ce résultat serait d'admettre que les bactéries ne manifestent pas de besoin alimentaire indépendant de la croissance.

Remarquons enfin que la concentration d'entretien étant nulle, il en résulte immédiatement qu'au moment où la croissance s'arrête il ne reste plus trace de l'aliment limitant. Nous verrons que cette conclusion est directement vérifiable par des dosages (chap. VI). Elle est du reste en contradiction avec certaines hypothèses, et c'est pourquoi elle doit être notée. EFRONT (1924) en effet, pense que la croissance des levures et des moisissures est arrêtée, non par épuisement proprement dit du milieu, mais par une modification dans la répartition des éléments nutritifs. Cette hypothèse n'est évidemment pas valable, au moins dans le cas qui nous occupe. CLEARY, BEARD et CLIFTON (1934) et CLIFTON (1937) concluent d'une série d'expériences assez complexes, que l'accumulation des produits toxiques joue un rôle secondaire et que l'arrêt de la croissance se produit par diminution du « *rapport du nombre de cellules à quelque constituant essentiel* ». Si l'on comprend bien la pensée des auteurs, ils invoqueraient une notion d'équilibre, analogue à celui de la loi d'action de masses. Cette hypothèse est évidemment en complète contradiction avec les faits qui viennent d'être exposés. Elle ne peut s'accommoder, ni de la constance du rendement avec différentes dilutions des aliments, ni du fait que la croissance ne s'arrête qu'une fois le milieu *complètement* épuisé en l'un de ses constituants.

*L'importance relative de l'intoxication et de l'inanition
comme facteurs d'arrêt.*

Il est certain que, dans toutes les expériences qui viennent d'être rapportées, le rôle des toxines ou des déchets toxiques est nul. Cette conclusion a d'autant plus d'importance au point de vue pratique que les souches et les milieux étudiés étaient fort variés. On a vu qu'elle s'applique à la croissance de deux espèces bactériennes profondément dissemblables. D'autre part, quoique les milieux utilisés soient beaucoup plus dilués que les milieux courants, les densités maximales atteintes sont assez importantes, d'un ordre de grandeur comparable à celles que l'on obtient ordinairement en bouillon.

Ces expériences sont donc de nature à nous faire douter de l'importance que peuvent avoir toxines spécifiques ou déchets toxiques dans l'arrêt de la croissance sur les milieux liquides courants (Le problème est tout différent pour les milieux solides où les populations atteignent des densités d'un ordre de grandeur incomparablement plus élevé). La mise en évidence de toxines spécifiques repose jusqu'ici sur deux types d'expérience réalisés par la plupart des auteurs. Le premier consiste à démontrer qu'un milieu où a poussé une souche donnée est encore capable de supporter la croissance d'une espèce différente, alors que les réensemencements de la première demeurent stériles. Cette expérience est insuffisante. Elle ne démontre pas la réalité d'une action inhibitrice, l'hypothèse d'un *appauvrissement spécifique* est tout aussi vraisemblable (GRAHAM SMITH, 1920). Elle l'est d'autant plus que la plupart de ces expériences ont été faites avec des bactéries pathogènes pour lesquelles la présence de vitamines diverses peut être nécessaire. Le second type d'expérience est plus démonstratif. Il consiste à ajouter à une culture jeune le filtrat d'une vieille culture. D'après BARNES (1931) cet essai, réalisé avec *B. coli* et *St. albus* donne des résultats négatifs. Il n'y aurait pas d'inhibition, mais simple dilution du milieu. L'addition d'eau distillée dans les mêmes proportions donne les mêmes résultats.

Notons enfin que les auteurs qui ont cherché à mettre en évidence des actions toxiques, spécifiques ou non, ont employé des filtrats de très vieilles cultures (par exemple 30 jours dans les expériences de

BESREDKA). D'autre part BESREDKA et ses élèves pensent que les toxines sont produites au moment de la dislocation des cellules bactériennes. Elles ne sauraient dans ce cas se produire, du moins en quantités importantes, *qu'après l'arrêt de la croissance*.

Des expériences exposées et de ces quelques remarques on peut conclure :

1^o Que, dans certaines conditions au moins, l'action des toxines est nulle.

2^o Que leur action limitante dans les milieux liquides courants n'est pas démontrée.

III

DONNÉES SUR LE RENDEMENT DE LA CROISSANCE SUR DIFFÉRENTS GLUCIDES

Les résultats qui viennent d'être exposés, outre leur intérêt propre, ont encore celui de justifier l'emploi d'une méthode particulièrement commode pour l'étude du rendement de la croissance en fonction de la nature de la source organique. Ce terme de rendement a été employé trop souvent dans un sens assez vague : pour exprimer, par exemple, les qualités d'un milieu de culture. On l'entendra ici au sens où l'emploie V. HENRI : le rendement matériel est le rapport de la matière organique *formée* à la matière organique *utilisée*. Chez les microorganismes, où la portion minérale est extrêmement faible, le poids de substance organique peut être identifié au poids total.

La détermination du rendement matériel exige que soit connu, outre le poids de substance vivante formée, le poids de matière organique *réellement utilisée* et non pas seulement *offerte*, c'est-à-dire présente dans le milieu au début de l'expérience. En outre elle ne peut avoir de valeur que dans la mesure où le rendement trouvé est indépendant de la concentration de la source organique. Il est évident que s'il n'en était pas ainsi, la comparaison des rendements sur différents aliments, même à égalité de concentration, serait extrêmement fragile, les variations du rendement avec la concentration de matière organique pouvant ne pas être du même ordre suivant la nature de cette source organique. Ces exigences sont réalisées

dans les conditions des expériences décrites aux paragraphes précédents. Le rapport :

$$\frac{\text{Croissance totale}}{\text{Concentration de la source organique}}$$

est, *dans ce cas*, l'expression fidèle du rendement, puisque l'on sait qu'il ne reste plus trace de la source organique au moment où la culture atteint son maximum. En revanche il n'en serait plus ainsi si quelqu'autre facteur limitant intervenait pour fixer le maximum, ou si la concentration d'entretien n'était pas nulle.

On ne trouve dans la littérature qu'un très petit nombre de données sur le rendement matériel de la croissance des bactéries. Encore celles que l'on possède sont-elles rarement utilisables, le « rendement » évalué par les auteurs n'ayant avec le rendement réel que des rapports indéterminés. FROUIN et GUILLAUMIE (1926) ont déterminé le rendement en poids du bacille tuberculeux sur un milieu synthétique contenant des concentrations croissantes de glycérine. Ils ont dosé la glycérine restant après l'expérience. Malheureusement ils n'ont pas suivi la croissance de leurs cultures, se contentant de prélever les bactéries après « quinze ou trente jours » d'étuve. On ne peut donc savoir si leurs déterminations n'ont pas été faites une fois le maximum réel dépassé, ce qui suffirait à leur enlever toute signification. En outre, et surtout, le milieu utilisé contenait à part la glycérine, de l'asparagine et du citrate de soude. Rien ne permet d'affirmer que le bacille tuberculeux soit incapable d'utiliser, au moins partiellement, ces deux corps comme source carbonée. Ainsi doivent s'expliquer les rendements extraordinairement élevés trouvés par FROUIN et GUILLAUMIE pour certaines concentrations (82,5 % dans un milieu contenant 3 % de glycérine). Les mêmes objections s'appliquent aux résultats apportés par TERROINE, TRAUTMANN, BONNET et HÉE (1926) concernant le rendement matériel de la croissance du bacille de la Fléole. Le milieu contenait en effet, outre du glucose, 0,5 % de peptone. La courbe de croissance n'a pas été suivie (1).

On possède, en revanche, quelques données précises sur le rendement matériel de la croissance de quelques champignons inférieurs,

(1) Il est nécessaire de marquer que ces objections ne s'appliquent pas à la détermination du *rendement énergétique*, but principal du travail cité.

en particulier de l'*Aspergillus* (RAULIN 1870, TERROINE et WURMSER 1922). Ce sont les seules qui pourront nous servir de terme de comparaison. Il y a donc là une lacune importante dans nos connaissances sur la physiologie bactérienne. Chercher à la combler par une étude systématique n'entre pas dans le plan du présent travail. Il a paru utile cependant de grouper ci-dessous un certain nombre de données réunies au cours de ce travail, données qui pourront apporter des indications utiles pour les recherches plus complètes qui s'imposent. Ces résultats concernent le rendement de la croissance de trois espèces bactériennes : *B. subtilis*, *B. coli* et *B. typhi-murium*, sur différents hydrates de carbone, comprenant les principales classes de glucides : polyalcools, pentoses, hexoses, disaccharides, polysaccharides. Dans tous les cas la croissance a été suivie assez longtemps pour que le maximum, et par conséquent la croissance totale, soit définie avec précision. Dans tous les cas il a été démontré auparavant que la croissance totale ne dépendait que de la concentration de la source carbonée, sans intervention d'aucun autre facteur limitant. Toutes les expériences ont été faites en présence de la même « constance saline » (milieu S).

Les tableaux XI, XII et XIII donnent : a) la concentration de sucre utilisée ; b) la croissance totale correspondante en unités de densité ; c) la croissance totale en mg. de poids sec par litre ; d) le rendement.

L'examen de ces tableaux montre tout d'abord que le rendement est beaucoup plus constant qu'on ne pouvait le supposer, étant donné la variété de structure des sources carbonées essayées. On pouvait penser, en effet, que les réactions de synthèses, au moins les premières de la chaîne, pouvant être différentes avec différents substrats, le rendement pourrait subir des variations importantes. D'autre part il paraissait probable que, pour certains sucres au moins, une partie de la molécule devait rester inutilisable. Il ne semble pas, à l'examen de ce tableau, que ce soit là un cas fréquent. Ou du moins, si certains chaînons carbonés sont inutilisables dans les synthèses, ils doivent alors pouvoir être utilisés pour la couverture des besoins énergétiques. C'est la conclusion à laquelle arrivent TERROINE et WURMSER (*loc. cit.*) dans leur étude sur le rendement matériel de croissance de l'*Aspergillus* sur différents glucides. Ils ont également trouvé un rendement remarquablement constant, ne

TABLEAU XI.

*Rendement matériel de la croissance de B. subtilis
aux dépens de différentes sources carbonées.*

Source carbonée	Concentration utilisée (mg. par litre)	Croissance totale (Unités de densité)	Croissance totale (mg. sec par litre) (1)	Rendement
<i>Polyalcools :</i>				
Inosite	150	32	25,6	0,17
Mannite	150	38,5	30,8	0,20
Sorbite	150	42,5	34,0	0,22
Dulcite	150	0,0		
<i>Hexoses :</i>				
Glucose	150	39	31,2	0,20
Fructose	150	42	33,6	0,22
Mannose	150	42	33,6	0,22
Galactose	100	0,0	0,0	
<i>Pentoses :</i>				
Xylose	200	0,0	0,0	—
Arabinose	150	44	35,2	0,23
<i>Méthylpentoses :</i>				
Rhamnose	150	0,0	0,0	—
<i>Disaccharides :</i>				
Saccharose	150	38,3	30,6	0,20
Maltose	150	49,0	31,2	0,20
Lactose	150	0,0	0,0	—
<i>Polysaccharides :</i>				
Dextrine	100	26,5	21,2	0,21

(1) Chiffres calculés d'après ceux de la colonne précédente.

s'éloignant guère du chiffre de 0,42. On voit que le rendement des bactéries étudiées est de beaucoup inférieur.

Quelques corps, cependant, se distinguent par un rendement particulièrement élevé ou particulièrement faible. Ainsi, le rendement de la croissance de *B. coli* et *B. typhi-murium* aux dépens du rham-

TABLEAU XII.

**Rendement matériel de la croissance de *B. coli*
aux dépens de différentes sources carbonées.**

Source carbonée	Concentration utilisée (mg. par litre)	Croissance totale (unités de densité)	Croissance totale (mg. sec par litre) (1)	Rendement
<i>Polyalcools :</i>				
Inosite.....	100	0,0	0,0	—
Mannite.....	200	63,0	50,5	0,25
Sorbite.....	150	46,0	37,0	0,25
Dulcite.....	150	53,0	42,5	0,28
<i>Hexoses :</i>				
Glucose.....	200	58,5	47,0	0,24
Fructose.....	150	41,5	33,0	0,22
Mannose.....	150	47,0	37,5	0,25
Galactose.....	150	45,0	36,0	0,25
<i>Pentoses</i>				
Xylose.....	150	40,0	32,0	0,21
Arabinose.....	200	60,5	48,5	0,24
<i>Méthylpentoses :</i>				
Rhamnose.....	150	30,0	24,0	0,16
<i>Disaccharides :</i>				
Saccharose.....	150	0,0	0,0	—
Maltose.....	150	45,5	36,5	0,24
Lactose.....	200	60,0	48,0	0,24
<i>Polysaccharides :</i>				
Dextrine.....	—	—	—	—

(1) Chiffres calculés d'après ceux de la colonne précédente.

nose est inférieur de près de 50 % au rendement moyen. Or le rhamnose se distingue de tous les autres corps essayés en ce qu'il est le seul à posséder un groupe méthyle. Cela semble indiquer que la présence d'un groupe méthyle rend inutilisable une partie de la molécule. Ce résultat est à rapprocher de ceux de KENDALL et

TABLEAU XIII.

*Rendement matériel de la croissance de B. typhi-murium
aux dépens de différentes sources carbonées.*

Source carbonée	Concentration utilisée (mg. par litre)	Croissance totale (unités de densité)	Croissance totale (mg. sec par litre) (1)	Rendement
<i>Polyalcools</i>				
Inosite.....	150	0,0	0,0	—
Mannite.....	150	47,0	37,5	0,25
Sorbitol.....	150	42,0	34,5	0,23
Dulcitol.....	150	51,0	41,0	0,27
<i>Hexoses :</i>				
Glucose.....	75	22,0	17,5	0,23
Fructose.....	150	38,0	30,5	0,20
Mannose.....	150	42,5	34,0	0,23
Galactose.....	150	42,5	34,0	0,23
<i>Pentoses :</i>				
Xylose.....	150	35,0	28,0	0,19
Arabinose.....	150	35,0	28,0	0,19
<i>Méthylpentose :</i>				
Rhamnose.....	150	24,0	19,0	0,13
<i>Disaccharides :</i>				
Saccharose.....	200	0,0	0,0	—
Maltose.....	150	36,0	29,0	0,19
Lactose.....	—	—	—	—

(1) Chiffres calculés d'après ceux de la colonne précédente.

GROSS (1930). Etudiant le pouvoir d'attaque de 10 souches bactériennes, ces auteurs ont montré que la méthylation diminuait en général la fermentescibilité des sucres : les dérivés plusieurs fois méthylés n'étaient attaquables que par un très petit nombre de souches, sinon complètement inutilisables. Il serait certainement du plus grand intérêt de poursuivre dans cette voie, et d'étudier

quantitativement le rendement d'une série de dérivés méthylés, ce que je n'ai pu faire encore, n'ayant pas eu entre les mains les corps nécessaires.

Il convient de noter d'ailleurs que ce ne sont pas toujours les corps les plus universellement et les plus « facilement » attaquables qui donnent les meilleurs rendements. Ainsi le rendement du glucose n'est pas particulièrement favorable, alors que celui de la dulcite est très élevé. Or, à en juger par le taux de croissance (V. chapitre IV, p. 81), la dulcite n'est que très difficilement, ou du moins très lentement attaquable, alors que la croissance aux dépens du glucose est très rapide. De même le rendement du saccharose pour *B. subtilis* est faible, alors que le taux de croissance correspondant à ce sucre est plus élevé que pour aucun autre.

Résumé et conclusions du chapitre III.

L'étude de la croissance totale des cultures de *B. coli* et *B. subtilis* en fonction de la concentration, soit de l'ensemble des aliments, soit de la seule source carbonée, met en évidence une relation linéaire extrêmement précise entre ces deux grandeurs. Le fait que cette relation soit vérifiée, et le fait que la croissance puisse dans tous les cas étudiés se poursuivre à taux constant jusqu'au delà des limites de densité atteintes dans les expériences, montrent que, dans les conditions de ces expériences, le rôle des toxines spécifiques et des déchets toxiques est nul.

Le rendement de la croissance est constant et indépendant de la dilution de l'aliment. La droite représentant la croissance totale en fonction de la concentration de l'aliment passe sensiblement par l'origine des coordonnées. On doit en conclure qu'il n'existe pas de concentration, si petite soit-elle, qui ne permette la croissance. D'autre part la constance du rendement indique que ni l'équilibre, ni la nature des réactions de synthèses ne sont modifiés en présence de concentrations extrêmement faibles d'aliment. Ces faits démontrent que les hypothèses attribuant l'arrêt de la croissance, soit à une modification dans la répartition des aliments, soit à l'établissement d'une sorte d'équilibre entre la densité de la culture et la concentration d'un ou plusieurs aliments, sont inapplicables.

Il résulte immédiatement de ces faits que l'aliment est entièrement épuisé au moment où s'arrête la croissance. La croissance

totale de la culture, rapportée à la concentration initiale de l'aliment, constitue donc *dans ce cas* une expression fidèle du rendement de la croissance aux dépens de l'aliment considéré. La comparaison des rendements fournis par diverses sources hydrocarbonées montre que les variations sont peu importantes. Il semble que les corps les plus aisément assimilables ne soient pas nécessairement les plus favorables au point de vue rendement.



CHAPITRE IV

Le taux de croissance.

I

INTRODUCTION

Le précédent chapitre a été consacré à l'étude de la croissance totale, c'est-à-dire du *rendement* de la croissance. Nous ne nous sommes pas préoccupés de savoir *comment* le maximum est atteint. Le présent chapitre, dans lequel on étudiera le *taux de croissance* en fonction de la concentration des aliments, est donc le complément nécessaire du précédent. On considérera ici le taux indépendamment du rendement. Il est fort possible, cependant, qu'il existe une relation nécessaire entre les variations de ces deux constantes. Cette question fera l'objet du chapitre suivant.

La valeur du taux de croissance dépend évidemment d'une foule de facteurs. On ne peut espérer qu'il jouisse, vis-à-vis des conditions de milieu, de l'indépendance relative qui semble caractériser le rendement. L'étude systématique de toutes les conditions susceptibles d'influencer le taux de croissance représenterait à elle seule un travail considérable, assez fastidieux d'ailleurs. On se limitera ici à l'étude de croissance en fonction :

1° De la concentration des aliments en général ; 2° de la concentration de la source hydrocarbonée ; 3° de la nature de la source hydrocarbonée. De ces expériences on peut espérer des résultats concernant :

A) L'interprétation analytique des courbes de croissance.

B) L'activité des synthèses, et la nature des réactions qui en déterminent la valeur.

* * *

Lorsque la croissance n'est limitée que par la concentration des aliments, la forme de la courbe représentative dépend entièrement de la nature de la relation qui unit taux de croissance et concentration de l'aliment limitant. Toute représentation analytique de la loi de croissance comporte nécessairement une hypothèse sur la nature de cette relation. Et il est indispensable de vérifier *directement* la valeur de cette hypothèse, car on ne saurait considérer comme une démonstration de sa validité le fait qu'elle n'interdit pas l'ajustement, même précis, d'une courbe de croissance théorique aux données expérimentales. Aussi est-il regrettable qu'en face de l'importante littérature consacrée à l'étude théorique de la croissance, il n'existe pour ainsi dire pas de données directes sur cette question. En ce qui concerne la croissance des microorganismes, il n'existe à notre connaissance qu'une brève note de PENFOLD et NORRIS (1912). Ce sont les seules données qu'il nous sera possible de confronter avec celles qui sont réunies dans ce chapitre. Quant aux travaux où la relation en question n'apparaît que sous la forme d'une hypothèse analytique plus ou moins explicite, nous n'avons pas à les considérer ici, leur discussion trouvant sa place au chapitre VIII. On doit noter cependant dès maintenant que, dans la grande majorité des cas, les auteurs ont admis, explicitement ou implicitement, que le taux de croissance est linéairement proportionnel à la concentration des substances nutritives. C'est ce qu'ont fait MAC KENDRICK et PAI (1911) dans un travail sur la croissance des cultures de *B. coli*, et DESCHAMPS (1901) qui cherchait à appliquer ses résultats théoriques à la croissance des levures. Et c'est aussi l'hypothèse qu'exprime la fonction *logistique* lorsqu'on l'applique à une population dont la croissance est limitée par la quantité d'aliments disponible. Aussi est-elle contenue implicitement dans un très grand nombre de travaux. On sait en effet que la logistique a été de beaucoup la plus employée des formules de croissance, et TEISSIER (1928, 1936) a montré comment des efforts, en apparence divergents, avaient tous abouti à cette même fonction. Pourtant l'hypothèse d'une relation linéaire entre le taux de croissance et la concentration de l'aliment n'est guère satisfaisante : il est évident que le taux de croissance ne saurait augmenter indéfiniment et doit, tôt ou tard, tendre vers une

limite. L'hypothèse linéaire ne peut être qu'une première approximation. Reste à savoir entre quelles limites elle est applicable et si même elle a un domaine de validité suffisant pour justifier son emploi. Seule l'étude expérimentale directe peut en décider et c'est pourquoi elle revêt une grande importance théorique. Ses résultats permettront éventuellement d'écarter certaines représentations analytiques, sinon d'en suggérer de nouvelles.

* * *

D'autre part la connaissance de la forme de la relation en question est la condition préalable de l'étude du taux de croissance en fonction de la nature des aliments. On possède à ce sujet d'assez nombreux documents, mais épars, recueillis en général dans des conditions assez mal définies, et qui ne permettent pas de comparaison utile. (Ils se rapportent presque toujours à des cultures en milieux naturels). Cette étude s'impose cependant si l'on songe que le taux de croissance n'exprime pas autre chose que l'activité des réactions de synthèses. Il constitue la mesure directe du métabolisme de croissance. Mesure plus fidèle et plus sûre, de ce point de vue, que celles des échanges gazeux. On trouvera à la fin de ce chapitre des données sur l'intensité de la croissance de *B. coli* et *B. subtilis* en présence d'un certain nombre d'hydrates de carbone. Celles-ci sont bien loin de combler l'importante lacune que l'on vient de signaler. Elles pourront cependant fournir des indications sur les rapports qui doivent exister entre l'activité des réactions de croissance et la structure des substrats.

Elles permettront surtout d'obtenir la solution d'un problème précis : si, comme il est permis de le prévoir, le taux de croissance tend vers une limite quand la concentration des aliments augmente, cette limite est-elle la même pour tous les aliments, ou au contraire existe-t-il une limite différente et caractéristique pour chaque aliment ou chaque catégorie d'aliments ? Il est clair que l'idée que l'on pourrait se faire de la nature des réactions qui limitent le taux de croissance dépend en premier lieu de la solution de cette question. Rien ne permet de prévoir, *a priori*, le résultat probable et il n'existe à ce sujet aucune donnée expérimentale.

II

LE TAUX DE CROISSANCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'ALIMENT

Choix d'une méthode de détermination.

Avant de discuter des méthodes qui permettent de déterminer le taux de croissance en fonction de la concentration des aliments, il est bon de se faire une idée approximative de la forme générale de

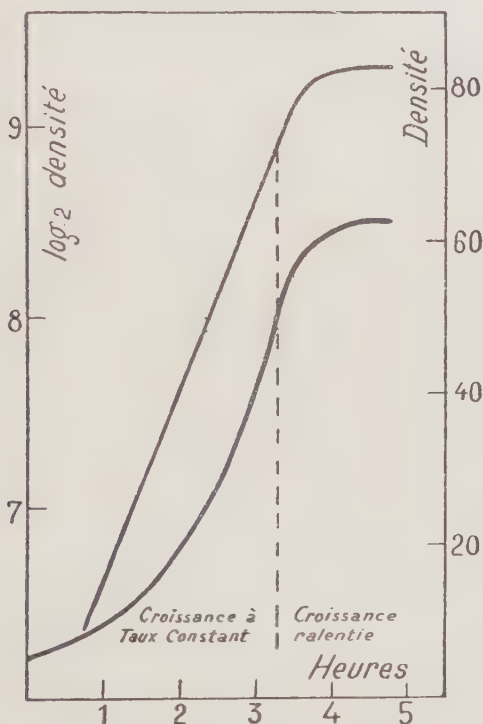


FIG. 12. — Croissance d'une culture de *B. coli* sur milieu synthétique lactosé. Ordonnée normale (à droite) et logarithmique (à gauche). La croissance à taux constant se poursuit pendant plus des trois quarts de la croissance totale.

cette relation. Il suffira pour cela de considérer une croissance limitée par l'épuisement de l'aliment. La figure 12 représente une telle courbe, en coordonnées normales et en coordonnées semi-logarith-

miques (*B. coli* sur milieu synthétique lactosé). On constate que la phase exponentielle est longue et bien définie. Elle se poursuit pendant les $\frac{3}{4}$ de la croissance totale. Autrement dit, pendant toute cette période le taux de croissance est constant. Or nous savons, d'après les résultats du chapitre III, que pendant ce temps la concentration de l'aliment limitant diminue, et nous verrons au chapitre VI que cette diminution est *exactement proportionnelle* à l'accroissement. Il est clair, par conséquent, que le taux de croissance est pratiquement indépendant de la dilution de l'aliment pour toute une série de valeurs de celle-ci. Il ne commence à baisser que quand la concentration devient très faible, mais alors la variation est très rapide comme le montre l'arrêt assez brusque de la croissance. Il est clair que la relation en question doit être représentée par une courbe tendant assez vite vers une asymptote.

Une première difficulté résulte donc de ce que les variations du taux ne sont importantes que dans une région de concentrations faibles, ne permettant qu'une croissance totale très petite. La seule méthode correcte et précise consisterait à déterminer le taux de croissance dans des milieux où la concentration de l'aliment limitant serait, grâce à quelque artifice, maintenue constante. Cette expérience est malheureusement impossible. Il n'existe pas d'artifice permettant de maintenir automatiquement à un taux constant (et très faible) la concentration d'une substance autre qu'un gaz. On ne peut songer à remplacer à intervalles rapprochés la quantité d'aliment détruite. La croissance est bien trop rapide pour cela, les concentrations intéressantes beaucoup trop faibles. (On voit que pour la culture dont la croissance est exprimée par le graphique ci-contre, il s'écoule à peine 1 heure entre le moment où le taux de croissance commence à baisser et l'arrêt, c'est-à-dire l'épuisement total du milieu ; cette période est beaucoup plus courte encore dans bien des cas).

On en est donc réduit à ne déterminer qu'une valeur approchée du taux de croissance en fonction de la concentration. Cela peut se faire par deux méthodes :

1^o) On peut se contenter d'évaluer la pente en coordonnées semi-logarithmiques de la phase exponentielle de cultures faites en présence de différentes concentrations initiales d'aliment. Cette méthode serait correcte s'il était possible de n'utiliser que le début de la courbe de croissance, jusqu'à une densité telle que la concentra-

tion d'aliment n'ait que fort peu varié. Malheureusement il n'est pas possible d'éliminer toujours complètement la phase de latence qui, dans les meilleures conditions, peut encore se manifester sous la forme d'un très léger ralentissement au début. On est donc amené à éliminer systématiquement les deux ou trois premiers points expérimentaux. La méthode reste applicable pour les fortes concentrations. Mais pour des concentrations faibles elle donne des résultats non seulement imprécis, mais systématiquement trop bas, le taux mesuré correspondant en fait à une concentration notablement plus faible que la concentration initiale. On peut cependant l'utiliser en première approximation. Elle nous indiquera en tous cas avec une certaine précision entre quelles limites le taux de croissance est pratiquement indépendant de la concentration.

2^o) La deuxième méthode a l'avantage, sinon d'être précise, au moins de ne pas entraîner d'erreur systématique. Elle consiste à suivre au cours de la croissance d'une culture les variations du taux en rapportant chaque valeur trouvée à la valeur moyenne de la concentration de l'aliment pendant l'intervalle considéré. Le taux moyen peut être calculé, dans chaque intervalle de deux points expérimentaux, par la formule déjà citée :

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{(T_2 - T_1) \log 2}$$

x_2 et x_1 étant les densités aux temps T_2 et T_1 .

Reste à déterminer la concentration moyenne de l'aliment limitant pendant le même intervalle. On pourrait, dans certains cas au moins, procéder à un dosage. Mais il est bien plus commode, et aussi plus précis, de calculer la concentration à partir de la densité moyenne atteinte par la culture. Pour que cela soit possible, il faut : 1^o que l'aliment soit complètement épuisé au moment précis où cesse la croissance ; 2^o que la disparition de l'aliment soit rigoureusement proportionnelle à l'accroissement (c'est-à-dire que le rendement au cours de la croissance soit invariable). La première condition est un corollaire évident des conclusions auxquelles nous avons été amenés par les expériences du chapitre III. Ces mêmes conclusions permettent de prévoir que la seconde condition doit être également réalisée. En outre la démonstration directe basée sur des dosages au cours de la croissance en sera donnée au chapitre VI. Nous avons donc le droit, à partir de la densité moyenne pendant

l'intervalle considéré, de calculer la concentration moyenne d'aliment correspondante. Celle-ci est évidemment donnée par :

$$C = C_o - \frac{C_o (x - x_o)}{M}$$

C étant la concentration moyenne cherchée, C_o la concentration initiale, M la croissance totale, x_o la densité au temps O et x la densité moyenne dans l'intervalle considéré.

Cette méthode est théoriquement correcte pour des intervalles très petits. Pour les intervalles plus grands, elle ne donne que des valeurs moyennes. Celles-ci ne sont pas entachées d'erreur systématique. En revanche elles sont nécessairement très imprécises puisqu'elles reposent sur deux mesures dont les erreurs absolues s'additionnent. De plus, l'erreur sur la détermination du taux est plus grande, en valeur relative, que la somme des erreurs sur la détermination des densités. C'est là un grave défaut qui ne peut être que partiellement compensé en multipliant les mesures, et en faisant figurer sur le même graphique les valeurs trouvées avec plusieurs cultures indépendantes. Elle doit cependant permettre de se faire une idée suffisamment précise de la forme de la relation étudiée. On ne doit pourtant pas renoncer à la première méthode qui, elle, permet, nous le verrons, une détermination précise du *taux de croissance maximum*.

Résultats expérimentaux.

I. RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE MÉTHODE.

Les tableaux et les graphiques suivants permettront de comparer les résultats obtenus avec deux souches (*B. coli* et *B. subtilis*) et trois milieux (un complexe et deux synthétiques). Les résultats bruts sont exprimés par les figures 13, 14 et 15. Celles-ci sont établies en coordonnées semi-logarithmiques. On y a figuré la phase exponentielle de la croissance d'un certain nombre de cultures sur différentes concentrations d'aliment limitant. Seuls les points expérimentaux certainement situés dans la phase exponentielle sont figurés. Il est fait abstraction des autres phases de la croissance. Il n'y a du reste pas d'ambiguïté à ce sujet, la phase exponentielle

étant toujours bien définie. L'interpolation a été faite par une méthode purement graphique, dont la précision est suffisante étant donné que les points expérimentaux s'alignent d'une manière satisfaisante. Le taux de croissance est calculé d'après la pente des

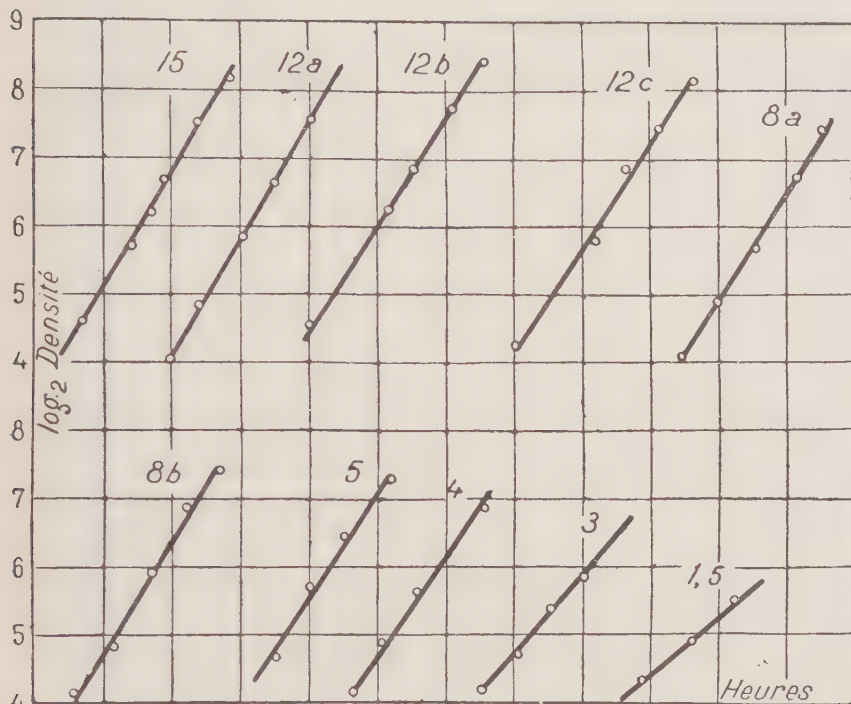


FIG. 13. — *B. subtilis* sur bouillon de cerveau de veau. Phase exponentielle de la croissance sur différentes concentrations de bouillon, indiquées en unités arbitraires.

droites d'interpolation. Les résultats du calcul sont résumés par les tableaux XIV, XV, XVI. Les conditions de culture et les méthodes de mesures ont été décrites plus haut. Il n'y a rien à y ajouter.

TABLEAU XIV.

B. subtilis sur bouillon de cervelle de veau. Taux de croissance et temps de division pendant la phase exponentielle en fonction de la concentration initiale de l'aliment.

Concentration initiale	Taux de croissance	Temps de division
15	1,67	36'
12 <i>a</i>	1,72	35'
12 <i>b</i>	1,67	36'
12 <i>c</i>	1,65	36'
8 <i>a</i>	1,65	36'
8 <i>b</i>	1,67	36'
5	1,64	37'
4	1,43	42'
3	1,18	52'
1,5	0,87	69'

a) *B. subtilis* sur milieu complexe. — Comme dans les expériences sur le rendement, les différentes concentrations d'aliment sont indiquées en unités arbitraires et correspondent à différentes dilutions avec de l'eau distillée d'une même solution mère : la concentration 1 correspond à une macération de 500 gr. de cervelle de veau dans un litre d'eau, diluée 100 fois.

On voit que le taux de croissance tend assez rapidement vers une limite, correspondant à 1,67 divisions à l'heure, c'est-à-dire à une division toutes les 36 minutes environ.

Cette limite est définie avec précision comme le montrent bien les chiffres se rapportant aux trois cultures de concentration 12 et aux deux cultures de concentration 8. Le taux de croissance ne baisse très sensiblement que pour la concentration 4. Encore le chiffre correspondant, et tous les chiffres inférieurs, sont-ils certainement trop faibles pour les raisons exposées plus haut.

b) *B. subtilis* sur milieu synthétique *S* + saccharose. — La limite est également bien définie, mais notablement inférieure à celle que l'on observe sur milieu naturel. Elle correspond à une division toutes les 50 minutes environ. (Taux de croissance 1,20). La forme de la courbe d'interpolation serait analogue à la précédente, mais la courbure serait plus accentuée. Il n'y a de baisse sensible du taux de croissance que pour une concentration très faible de saccharose : 5×10^{-5} .

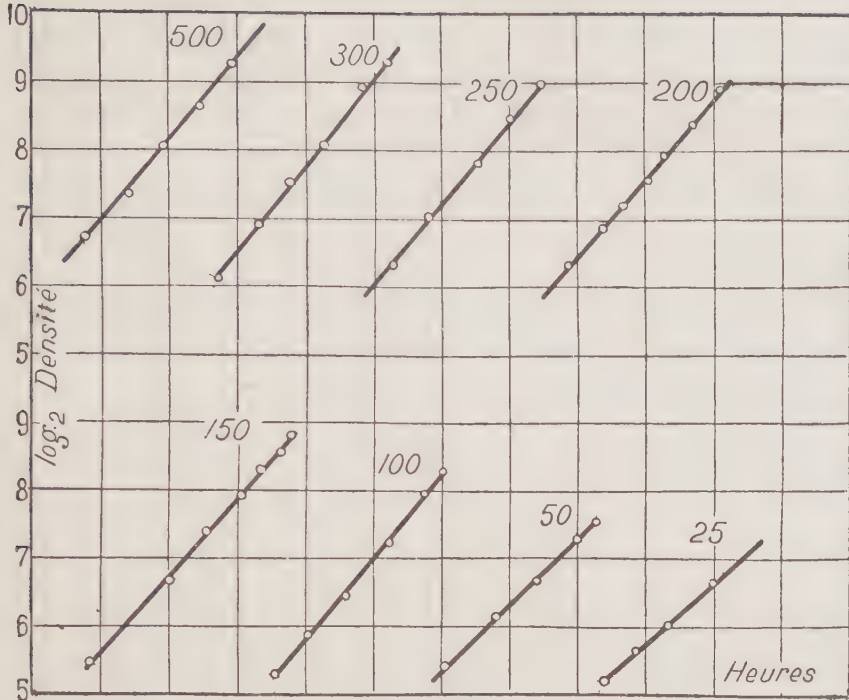


FIG. 14. — *B. subtilis* sur milieu synthétique. Phase exponentielle de la croissance en présence de différentes concentrations de saccharose (en mg. par litre).

TABLEAU XV.

B. Subtilis sur milieu S + saccharose. Taux de croissance et taux de division pendant la phase exponentielle en fonction de la concentration initiale du milieu en saccharose.

Concentration initiale (mg. par litre)	Taux de croissance (nombre de divisions à l'heure)	Temps de division en minutes
500	1,18	51'
300	1,21	50'
250	1,20	50'
200	1,18	51'
150	1,18	51'
100	1,20	50'
50	1,00	60'
25	0,85	70'

c) *B. coli* sur milieu synthétique *S* + mannite. — La limite est particulièrement bien définie ; on doit considérer que le taux de croissance est pratiquement invariable entre 80 et 200 milligrammes de mannite par litre. On observera que les points expéri-

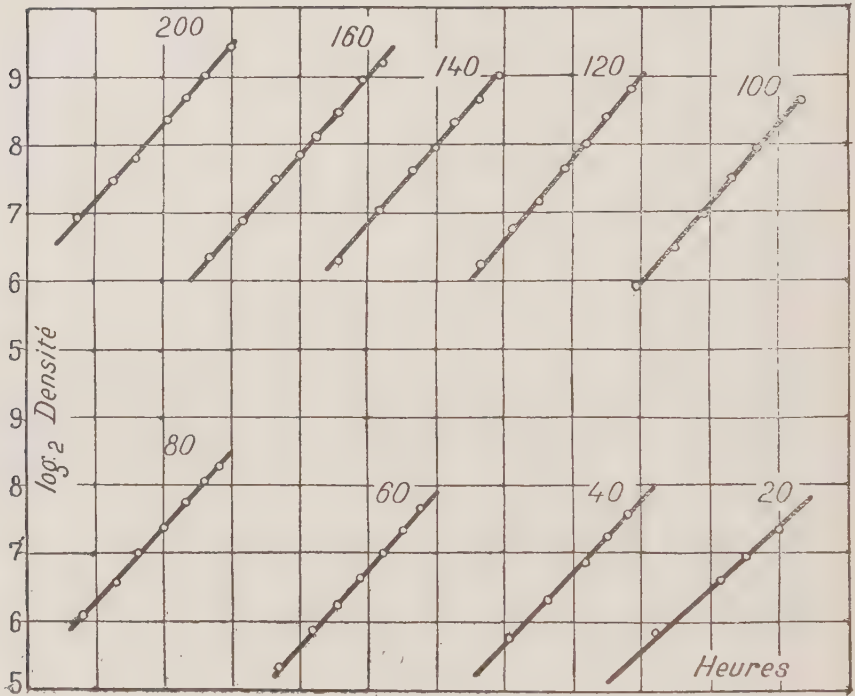


FIG. 15. — *B. coli* en milieu synthétique. Phase exponentielle de la croissance en présence de différentes concentrations de mannite (en mg. par litre).

mentaux s'alignent avec une précision remarquable. Le taux de croissance moyen, pour toutes les courbes, de la concentration 80 à la concentration 200, correspond à une division toutes les 50' 30" environ (Taux de croissance = 1,19).

On remarquera que dans toutes ces expériences les concentrations les plus faibles correspondent à des valeurs encore élevées du taux de division. Il est impossible, en effet, par cette méthode, d'étudier des concentrations très faibles : dans les expériences concernant *B. coli* sur mannite, par exemple, la croissance totale de la culture correspondant à la concentration 20 était de 6,5 unités de densité (5,2 mg. sec par litre). On ne pourrait raisonnablement prendre en

considération les chiffres fournis par des cultures encore moins denses. Il n'y a plus alors de phase exponentielle bien définie.

TABLEAU XVI.

B. coli sur milieu synthétique S + mannite. Taux de croissance et temps de division pendant la phase exponentielle en fonction de la concentration initiale en mannite.

Concentration initiale (mg. par litre)	Taux de croissance (nombre de divisions à l'heure)	Temps de division en minutes
200	1,18	51'
160	1,18	51'
140	1,20	50'
120	1,21	50'
100	1,18	51'
80	1,18	51'
60	1,17	51'
40	1,11	55'
20	1,00	60'

II. RÉSULTATS DE LA DEUXIÈME MÉTHODE.

On a vu que cette méthode, quoique théoriquement plus correcte que la première, donne nécessairement des résultats comportant une marge d'erreur très importante. Aussi convient-il de multiplier les mesures et ne peut-on se contenter des points expérimentaux que pourrait fournir une seule courbe de croissance. Les tableaux et les graphiques suivants combinent chacun les données de plusieurs cultures : cinq ou six suivant les cas. Il a paru préférable cependant de grouper à l'intérieur de chaque tableau les données provenant de la même croissance. On a systématiquement éliminé les chiffres se rapportant à la phase de début de chaque croissance (correspondant ou du moins pouvant correspondre à la phase de latence). D'autre part, les données se rapportant aux faibles concentrations étant beaucoup moins nombreuses, on a cherché à compenser ce déséquilibre en ne considérant que la fin de la croissance pour un certain nombre de cultures. (Celles-ci n'étaient du reste pas toutes de même concentration initiale). Les tableaux donnent, en regard de l'intervalle de densité considéré, l'intervalle de temps correspondant (en heures et centièmes), la concentration moyenne de l'aliment pendant cet intervalle (en mg. par litre), le taux de croissance (nombre de

divisions à l'heure) et le temps de division en minutes. On trouvera ici trois séries de résultats se rapportant à la croissance de *B. coli* sur milieu *S* + glucose (Tableau XVII), mannite (Tableau XVIII) et lactose (Tableau XIX).

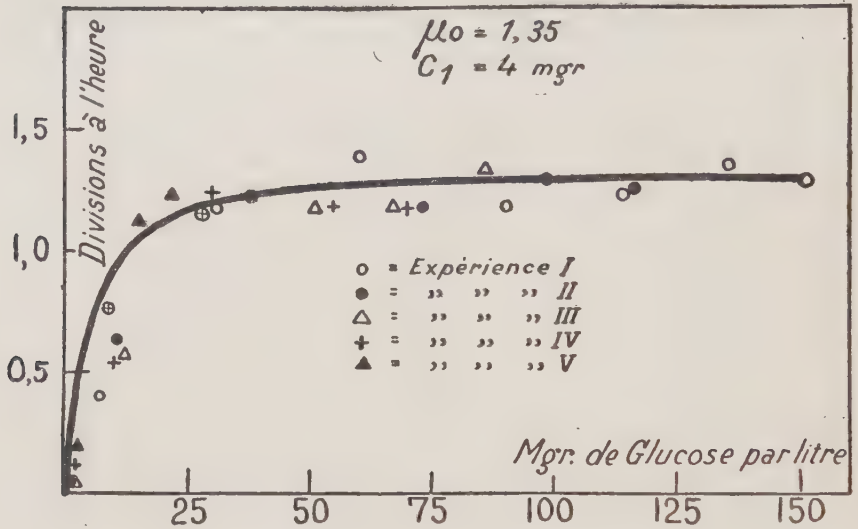


FIG. 16. — Taux de croissance des cultures de *B. coli* en milieu synthétique en fonction de la concentration du milieu en glucose.

L'inspection des figures 16, 17 et 18 qui résument ces résultats, malgré la dispersion des points expérimentaux, révèle clairement la forme générale de la relation qui unit taux de croissance et concentration de l'aliment limitant. Il est évident, surtout dans le cas du glucose (fig. 16) et de la mannite (fig. 17), que le taux de croissance est presque indépendant de la concentration de l'aliment jusqu'à des valeurs extrêmement faibles de celle-ci. Dans le cas de la mannite par exemple, si la moyenne des points compris entre 0 et 10 mg. par litre donne un taux de croissance de 0,46, les points compris entre 10 et 20 mg. donnent 1,13, alors que la *limite*, déterminée par les expériences de la série précédente, est de 1,19 environ. On peut donc la considérer comme pratiquement atteinte alors que la concentration du sucre est de l'ordre de 2×10^{-5} . Avec le glucose les résultats sont sensiblement les mêmes. Ils sont nettement différents avec le lactose (fig. 18); le taux de croissance limite est atteint plus lentement que dans les cas précédents. On

ne peut le considérer comme pratiquement atteint qu'à partir de 100 mg. par litre.

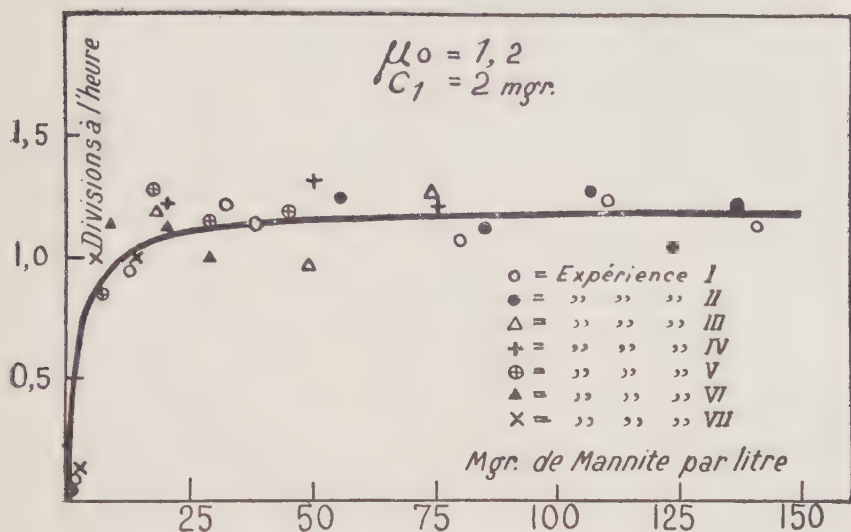


FIG. 17. — Taux de croissance des cultures de *B. coli* en milieu synthétique en fonction de la concentration du milieu en mannite.

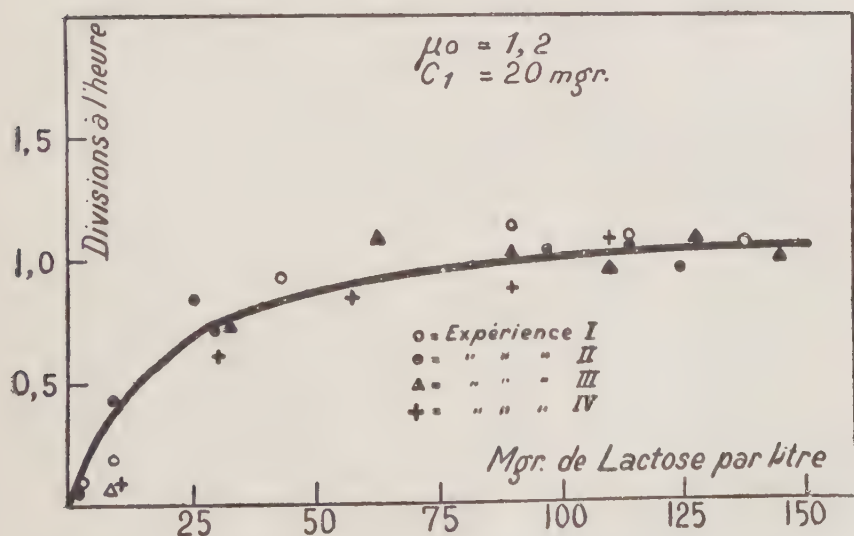


FIG. 18. — Taux de croissance des cultures de *B. coli* en milieu synthétique, en fonction de la concentration du milieu en lactose.

TABLEAU XVII.

Taux de croissance et temps de division des cultures de B. coli en fonction de la concentration moyenne du milieu en glucose.

Intervalle de densité	Intervalle de temps	Concen ion moyenne	Taux de croissance moyen	Temps de division moyen
<i>Culture I :</i>				
55,5-59,5	0,26	7	0,38	158'
46,0-55,5	0,23	30	1,17	51'
46,0-36,5	0,24	60	1,38	43'
29,4-36,5	0,27	90	1,16	52'
22,5-29,4	0,30	115	1,22	49'
16,8-22,5	0,33	135	1,32	45'
13,2-16,8	0,27	150	1,28	47'
10,2-13,2	0,30	160	1,24	48'
<i>Culture II :</i>				
54,0-54,5	0,26	1	0,05	1200'
48,8-54,0	0,24	11	0,61	98'
38,0-48,8	0,30	38	1,20	50'
28,7-38,0	0,35	73	1,16	52'
22,8-28,7	0,26	98	1,27	47'
17,8-22,8	0,29	116	1,23	49'
<i>Culture III :</i>				
47,5-47,8	0,26	2	0,03	2000'
41,8-47,5	0,33	12	0,56	107'
33,0-41,8	0,29	51	1,17	51'
26,3-33,0	0,28	67	1,17	51'
20,5-26,3	0,28	85	1,29	46'
<i>Culture IV :</i>				
42,5-42,8	0,26	1	0,04	1500'
37,8-42,5	0,33	10	0,53	113'
29,8-37,8	0,28	30	1,22	49'
23,5-29,8	0,29	55	1,18	51'
18,8-23,5	0,28	70	1,15	52'
<i>Culture V :</i>				
32,8-37,3	0,25	8	0,74	51'
25,0-32,8	0,34	28	1,15	52'
18,9-25,0	0,29	50	1,39	43'

TABLEAU XVIII.

Taux de croissance et temps de division des cultures de B. coli en fonction de la concentration moyenne du milieu en mannite.

Intervalle de densité	Intervalle de temps	Concentration moyenne	Taux de croissance moyen	Temps de division moyen
<i>Culture I :</i>				
71,6-72,5	0,29	2	0,06	1130'
53,2-71,6	0,35	32	1,22	49'
42,5-53,2	0,31	80	1,07	58'
34,0-42,5	0,26	110	1,24	48'
23,2-34,0	0,49	140	1,12	54'
<i>Culture II :</i>				
59,5-60,0	0,32	1	0,04	1500'
49,5-59,5	0,28	13	0,95	63'
36,5-49,5	0,35	55	1,25	48'
28,7-36,5	0,31	85	1,12	54'
23,0-28,7	0,25	106	1,27	47'
17,9-23,0	0,35	123	1,03	58'
12,0-17,9	0,48	137	1,20	50'
<i>Culture III :</i>				
41,2-52,5	0,29	18	1,20	50'
32,8-41,2	0,34	49	0,96	62'
25,2-31,8	0,30	74	1,27	47'
<i>Culture IV :</i>				
46,0-46,5	0,29	1	0,05	1200'
34,5-46,0	0,34	20	1,22	49'
26,2-34,5	0,30	50	1,32	45'
20,1-26,2	0,32	73	1,19	50'
<i>Culture V :</i>				
20,0-23,5	0,27	6	0,86	70'
16,0-20,0	0,25	17	1,28	47'
12,5-16,0	0,31	29	1,15	52'
9,7-12,5	0,32	38	1,14	53'
7,4- 9,7	0,33	45	1,18	51'
<i>Culture VI :</i>				
14,9-19,5	0,33	8	1,16	52'
11,5-14,9	0,33	20	1,13	53'
7,9-11,5	0,54	29	1,00	60'
<i>Culture VII :</i>				
12,5-12,7	0,32	1	0,07	60'
9,8-12,5	0,35	5	1,00	60'
6,8- 9,8	0,53	13	1,01	59'

TABLEAU XIX.

Taux de croissance et temps de division des cultures de B. coli en fonction de la concentration moyenne du milieu en lactose.

Intervalle de densité	Intervalle de temps	Concentration moyenne	Taux de croissance moyen	Temps de division moyen
<i>Culture I :</i>				
61,3-62,5	0,37	2	0,07	860'
38,3-61,3	0,38	9	0,19	550'
48,5-58,3	0,37	29	0,72	85'
38,8-48,5	0,35	43	0,92	65'
30,0-38,8	0,33	90	1,13	53'
23,0-30,0	0,36	114	1,06	56'
15,5-23,0	0,54	137	1,05	57'
<i>Culture II :</i>				
66,5-67,8	0,38	2	0,07	860'
59,6-66,5	0,37	19	0,43	139'
48,5-59,6	0,36	25	0,83	81'
37,8-48,5	0,37	94	1,03	58'
29,2-37,8	0,32	114	1,09	55'
22,8-29,2	0,38	124	0,94	64'
15,8-22,8	0,52	158	1,02	59'
<i>Culture III :</i>				
56,0-56,5	0,31	1	0,04	1500'
52,5-56,0	0,37	8	0,25	240'
42,7-52,5	0,40	30	0,74	81'
33,5-42,7	0,32	62	1,09	55'
26,3-33,5	0,35	89	1,00	60'
21,0-26,3	0,34	110	0,96	62'
15,9-21,0	0,37	127	1,08	62'
11,0-15,9	0,53	144	1,00	60'
<i>Culture IV :</i>				
44,5-45,0	0,35	3	0,04	1500'
43,5-44,5	0,35	4	0,09	590'
39,0-43,5	0,38	10	0,40	150'
33,9-39,0	0,33	30	0,61	98'
27,7-33,9	0,35	57	0,84	71'
22,5-27,7	0,35	80	0,86	70'
11,9-22,5	0,88	110	1,06	57'

Discussion des résultats.

L'ensemble de ces résultats démontre que la relation étudiée, bien loin d'être linéaire, est au contraire représentée par une courbe tendant très vite vers une asymptote horizontale. PENFOLD et NORRIS (1912) avaient obtenu des résultats comparables. Quoique ces auteurs n'aient employé que la première méthode et que, par conséquent, leurs chiffres ne puissent être considérés comme donnant les valeurs réelles du taux de croissance en fonction de la concentration des aliments, leurs expériences démontraient suffisamment que le taux de croissance de *B. coli* en présence de concentrations croissantes de peptone tend rapidement vers une limite. Leurs résultats auraient pu suffire pour démontrer que l'hypothèse, fréquemment faite par les théoriciens, d'une relation linéaire entre la concentration des aliments et le taux de croissance est loin de correspondre à la réalité. Les limites entre lesquelles une telle hypothèse pourrait être considérée comme suffisante en première approximation sont extraordinairement étroites, et comprises dans une zone de concentrations très inférieure à celles qui sont utilisées (et utilisables) en pratique. Dans certains cas, tel que celui de la croissance de *B. coli* sur mannite, on pourrait presque dire que tout se passe comme si le taux de croissance était indépendant de la concentration (1).

Il résulte de tout cela que, lorsque la croissance est limitée par l'épuisement des aliments, elle ne peut se représenter par l'équation d'une courbe logistique, ni par aucune fonction pouvant se ramener à celle-là. (On sait que c'est le cas de la plupart des équations de croissance). Nous aurons l'occasion, au chapitre VIII, de discuter cette question du point de vue mathématique. Mais il n'est nul besoin d'une discussion mathématique pour apercevoir que, lorsque l'appauvrissement en aliments est le seul facteur limitant, la courbe de croissance doit, d'une manière générale, être nettement dissymétrique par rapport à son point d'inflexion, puisque la croissance à taux constant, c'est-à-dire la phase exponentielle, se prolonge jus-

(1) Il est intéressant d'opposer ces résultats à ceux de FRIEDLEIN déjà cités au chapitre précédent. Il apparaît que le taux de croissance est encore voisin du maximum pour des concentrations de sucre que cet auteur considérait comme trop faibles pour supporter la croissance.

qu'aux abords immédiats du maximum. Cette conclusion est d'un intérêt pratique immédiat : elle permet de discerner à première vue, d'après la forme générale de la courbe de croissance, si d'autres facteurs que l'appauvrissement en aliments contribuent à limiter le taux de croissance. Si la phase exponentielle est courte, le point d'inflexion situé assez bas, il est à peu près certain que d'autres facteurs limitants sont en jeu. C'est là un critère fort commode que j'ai fréquemment eu l'occasion d'employer.

Le fait que le taux de croissance puisse demeurer maximum alors que la concentration de l'aliment atteint des valeurs extrêmement faibles peut paraître très surprenant. Il paraît bien, cependant, en accord avec d'autres données concernant la physiologie des microorganismes et mettant en évidence une relation analogue dans d'autres catégories de phénomènes. Beaucoup d'auteurs ont mesuré la consommation d'oxygène des bactéries en fonction de la tension de ce gaz dans le milieu. A quelques rares exceptions près (SCHLAYER 1936), ces mesures révèlent que l'intensité respiratoire est, dans une très large mesure, *indépendante* de la tension de l'oxygène et ne baisse que pour des tensions très basses. WARBURG et KUBOWITZ (1931) ont montré que l'intensité respiratoire de *Micrococcus candidans* était la même sous 10^{-5} atmosphères et dans l'air. SHOOP (1930) a obtenu des résultats analogues avec les bactéries lumineuses. La respiration ne baisse sensiblement que pour les pressions inférieures à 23 mm. de mercure.

D'autre part la même loi se retrouve dans une catégorie de phénomènes dont le lien avec ceux qui déterminent le taux de croissance est certainement très étroit : étudiant la vitesse de réduction du bleu de méthylène par une série d'hydrates de carbone, en présence de « bactéries non proliférantes », QUASTEL et WETHAM (1925) ont montré que le temps de réduction est à peu près indépendant de la concentration du substrat tant que la concentration n'est pas très petite. (Et il faut noter que le phénomène est spécialement marqué dans le cas des sucres, en particulier pour le glucose). L'allure générale de la relation trouvée par ces auteurs est tout à fait analogue à celle que mettent en évidence les figures 16, 17 et 18. On peut être tenté de voir là l'explication des phénomènes qui ont été décrits dans ce chapitre. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question après avoir passé en revue les données concernant le taux de croissance en fonction de la nature des aliments. Rappelons enfin

que l'équilibre entre hémoglobine et oxyhémoglobine en fonction de la tension d'oxygène s'exprime par une loi hyperbolique (BARCROFT, 1925). Sans vouloir chercher là un « modèle physico-chimique » il est permis d'en conclure au moins à une analogie générale entre les deux mécanismes, l'un et l'autre représentant un phénomène de saturation.

CHOIX D'UNE FORMULE D'INTERPOLATION.

Les résultats exposés au chapitre III nous ont permis de mettre en évidence entre la croissance totale et la concentration de l'aliment une relation particulièrement simple, que l'expérience vérifie avec une remarquable précision. L'imprécision des résultats ne nous permet pas d'en faire autant en ce qui concerne le taux de croissance. Il pourra être utile cependant de disposer d'une formule exprimant cette relation d'une manière suffisamment vraisemblable. En fait, toute courbe d'allure sigmoïde pourrait être ajustée aux données expérimentales. Le choix ne sera donc guidé que par des considérations de commodité et de vraisemblance. Une formule logarithmique ne saurait convenir puisque le taux de croissance tend visiblement vers une limite finie. Il paraît logique, en revanche, d'adopter une forme hyperbolique, analogue à celle qui exprime la saturation de l'hémoglobine en fonction de la tension d'oxygène. Cette formule, d'autre part, est d'un emploi commode et permet l'intégration de l'équation générale de croissance (V. chap. VIII, p. 124). Les courbes d'interpolation tracées sur les figures 16, 17 et 18, expriment la relation :

$$\mu = \mu_0 \frac{C}{C_1 + C} \quad (1)$$

μ étant le taux de croissance, C la concentration de l'aliment limitant, μ_0 et C_1 deux constantes. La signification physiologique de ces deux constantes est claire. On voit que le rapport :

$$\frac{C}{C_1 + C}$$

tend vers 1 quand C est grand par rapport à C_1 . μ_0 représente donc le *taux de croissance maximum*. Ce même rapport est égal à $1/2$ quand $C_1 = C$. C_1 est donc la *concentration d'aliment pour laquelle le taux de croissance est égal à la moitié du maximum*. La courbure de la

courbe représentative est d'autant plus accentuée que C_1 est plus petit. Les valeurs adoptées pour l'interpolation des résultats ont été :

- | | |
|--|------------|
| 1° <i>B. coli</i> sur glucose (fig. 16) $\mu_o = 1,35$ | $C_1 = 4$ |
| 2° <i>B. coli</i> sur mannite (fig. 17) $\mu_o = 1,2$ | $C_1 = 2$ |
| 3° <i>B. coli</i> sur lactose (fig. 18) $\mu_o = 1,2$ | $C_1 = 20$ |

Les valeurs de la constante μ_o sont définies avec précision. Pour C_1 l'expérience ne fournit qu'un ordre de grandeur.

II

LE TAUX DE CROISSANCE EN FONCTION DE LA NATURE DES ALIMENTS

Les expériences qui viennent d'être passés en revue fournissent déjà des résultats importants en ce qui concerne la relation entre le taux de croissance et la nature des aliments. Elles suffisent à démontrer que le taux de croissance *ne tend pas vers une limite fixe*, mais que celle-ci, au contraire, *varie suivant la nature de l'aliment* limitant : pour *B. subtilis* sur milieu complexe, la limite est de 1,70 division à l'heure. Sur milieu synthétique + saccharose elle est de 1,25 environ. Elle varie même suivant la nature du sucre employé comme source hydrocarbonée : chez *B. coli*, la limite est de 1,20 pour la mannite et le lactose, de 1,35 pour le glucose. Ces différences sont tout à fait significatives, étant donné la précision avec laquelle la limite est déterminée. L'expérience montre en outre, que la valeur de la constante C_1 , exprimant la rapidité avec laquelle la limite est atteinte, varie également suivant la nature de la source hydrocarbonée. Il est regrettable qu'elle ne puisse être fixée avec plus de précision ; il est clair cependant qu'elle est beaucoup plus élevée pour le lactose que pour les deux autres sucres.

On trouvera dans cette section des données destinées à compléter dans une certaine mesure ces premières indications. Elles concernent :

1° La valeur du taux de croissance limite pour *B. subtilis* et *B. coli*, en milieu synthétique, suivant la nature du glucide employé comme source carbonée. Ces données pourront nous indiquer si il

existe un rapport général entre la structure de l'hydrate de carbone et le taux de croissance.

2° La valeur du taux de croissance dans des milieux contenant des *mélanges* de certains glucides : il est permis en effet de supposer que, si d'une part le taux de croissance dépend étroitement de l'activité de l'attaque des substrats, si d'autre part cette attaque est déterminée par des enzymes agissant indépendamment les uns des autres, et dont les effets sont par conséquent additifs, le taux de croissance dans des mélanges de glucides (dans certains mélanges tout au moins) pourra être plus élevé qu'en présence de chaque glucide séparément. Les expériences en question sont destinées à vérifier cette hypothèse.

Résultats expérimentaux.

1° TAUX DE CROISSANCE

EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES SOURCES CARBONÉES.

Il s'agit de déterminer le *taux de croissance limite*. Nous avons vu que dans la plupart des cas cette limite est pratiquement atteinte dès que la concentration de la source carbonée n'est pas très faible. Les expériences ont été faites avec des concentrations de sucre variant de 100 à 200 mg. par litre. L'inspection des courbes de croissance permet d'ailleurs de s'assurer qu'on est bien dans la région des concentrations correspondant au taux de croissance maximum : il suffit de vérifier que la phase exponentielle occupe la plus grande partie de la courbe de croissance. Les taux de croissance réunis dans les tableaux ci-dessous ont été calculés d'après la pente de la phase exponentielle, en coordonnées semi-logarithmiques.

Il convient de se demander quelle est la précision de ces déterminations, et quelles différences peuvent être considérées comme significatives. L'examen des résultats réunis dans la section précédente montre que, dans une série de mesures, l'écart ne dépasse qu'exceptionnellement 5 %. On peut admettre avec certitude que des différences atteignant 10 % sont significatives (1).

(1) On doit signaler, d'autre part, une cause d'erreur possible. Il se peut que certains des glucides employés aient contenu des traces de facteurs de

TABLEAU XX.

Taux de croissance et temps de division des cultures de *B. subtilis* en milieu S suivant la nature de la source carbonée.

Source carbonée	Taux de croissance (nombre de divisions à l'heure)	Temps de division (en minutes)
<i>Polyalcools :</i>		
Glycérine.....	1,31	46'
Mannite.....	1,10	55'
Sorbite.....	1,25	48'
Inosite	1,09	55'
<i>Hexoses :</i>		
Glucose.....	1,21	50'
Fructose	1,22	49'
Mannose.....	1,05	57'
<i>Pentoses :</i>		
Arabinose.....	0,84	71'
<i>Disaccharides :</i>		
Saccharose	1,25	48'
Maltose.....	1,00	60'
<i>Trisaccharide :</i>		
Raffinose	0,67	90'
<i>Polysaccharide :</i>		
Dextrine.....	0,87	69'

croissance et que ceux-ci aient une action sur le taux de croissance maximum. Il serait donc intéressant de reprendre quelques-unes de ces déterminations avec des glucides de synthèse.

TABLEAU XXI.

Taux de croissance et temps de division des cultures de B. coli en milieu S suivant la nature de la source carbonée.

Source carbonée	Taux de croissance (nombre de divisions à l'heure)	Temps de divisions (en minutes)
<i>Polyalcools :</i>		
Mannite.....	1,20	50'
Sorbite.....	1,10	55'
Dulcite	0,62	97'
<i>Hexoses :</i>		
Glucose.....	1,35	45'
Fructose.....	1,04	58'
Mannose.....	1,04	58'
Galactose.....	1,18	51'
<i>Pentoses :</i>		
Arabinose.....	1,09	55'
Xylose	1,06	56'
<i>Méthylpentose :</i>		
Rhamnose.....	0,25	240'
<i>Disaccharides :</i>		
Maltose.....	0,91	66'
Lactose.....	1,10	60'

2° TAUX DE CROISSANCE DANS DES MÉLANGES DE SUCRE.

Les résultats de ces expériences, faites dans des conditions identiques aux précédentes, sont résumés par les tableaux XXII et XXIII. En regard du taux de croissance correspondant au mélange, on a rappelé le taux de croissance correspondant à chaque constituant.

TABLEAU XXII.

Taux de croissance maximum des cultures de B. subtilis en présence d'un mélange de deux hydrates de carbone.

Constituants du mélange	Taux sur le premier	Taux sur le second	Taux sur le mélange
Glucose-Saccharose.....	1,21	1,25	1,28
Saccharose-Fructose.....	1,25	1,22	1,25
Sorbite-Dextrine	1,25	0,87	1,25
Sorbite-Maltose	1,25	1,00	1,14

TABLEAU XXIII.

Taux de croissance maximum des cultures de B. coli en présence d'un mélange de deux hydrates de carbone.

Constituants du mélange	Taux sur le premier	Taux sur le second	Taux sur le mélange
Glucose-Mannite.....	1,35	1,22	1,31
Glucose-Mannose.....	1,35	1,04	1,25
Glucose-Fructose.....	1,35	1,04	1,21
Sorbite-Maltose	1,25	0,91	1,02

Pour ces expériences on a dû tenir compte du fait que beaucoup de combinaisons de sucres ne sont pas réalisables : on verra dans la deuxième partie de ce travail que, pour certains couples de sucres, *tout se passe comme si les deux constituants n'étaient pas simultanément assimilables*. Il n'y a pas alors de taux correspondant à la croissance sur le mélange. On observe deux phases exponentielles au cours de la croissance, avec les taux caractéristiques de chaque constituant individuel. Nous n'avons pas à considérer ces cas pour l'instant, il suffit de marquer que pour les combinaisons étudiées ici, l'assimilation des deux constituants est bien *simultanée*. La démonstration en sera donnée dans la deuxième partie (chap. II, p. 181).

Discussion des résultats.

Les résultats que l'on vient d'exposer montrent que si le taux de croissance tend vers une limite quand la concentration des aliments

augmente, cette limite n'est pas fixe, mais différente suivant la nature des substrats. En présence de différents hydrates de carbone, on constate que le taux de croissance maximum varie dans des proportions beaucoup plus importantes que le rendement de la croissance aux dépens des mêmes corps. Nous avons vu, en effet, que le rendement était remarquablement stable, alors que pour le taux de croissance on trouve des différences qui vont du simple au quintuple. (Le taux de croissance du Coli-bacille sur rhamnose est de 0,25, sur glucose il est de 1,35). Il pourra être utile pour cette discussion de considérer le classement obtenu en rangeant les sucres essayés par ordre de taux décroissant. On obtient pour *B. subtilis* :

glycérine > saccharose, glucose, fructose, sorbite > mannite, inosite > maltose > arabinose > dextrine > raffinose.

et pour *B. coli* :

glucose > mannite > sorbite > fructose, mannose, arabinose, xylose > lactose > maltose > dulcite > rhamnose.

Il n'apparaît dans ces deux listes aucun rapport étroit entre la structure chimique et la place dans le classement. On doit noter cependant le taux de croissance exceptionnellement bas qui caractérise le rhamnose. Nous avons vu qu'il était également caractérisé par un rendement très bas, et nous avons rappelé à ce sujet les résultats de KENDALL *et al.* (V. p. 54). Mais il faudrait se garder de voir là la démonstration d'un rapport quelconque entre le rendement et le taux de croissance de chaque sucre. Les cas de la dulcite et du glucose, déjà notés (p. 56), indiquent une corrélation en sens inverse, qui paraît plus générale.

En revanche, la comparaison de ces résultats avec ceux des auteurs qui ont étudié l'activité des enzymes est extrêmement suggestive. QUASTEL et WETHAM (1925), étudiant la vitesse de réduction du bleu de méthylène par divers sucres en présence de *B. coli* « non proliférant », montrent que le glucose est de beaucoup le donateur le plus puissant, mannite et sorbite viennent immédiatement après. La dulcite est presque inactive : pour le rhamnose, ils n'observent pas de réduction en quatre heures. Le classement obtenu est dans l'ensemble identique à celui que l'on vient d'établir. Nous avons vu, d'autre part, que ces mêmes auteurs ont mis en évidence, entre la concentration du substrat et la vitesse de réduction, une relation

tout à fait analogue à celle qui lie la concentration d'aliment au taux de croissance.

Si l'on consent à se représenter schématiquement la croissance comme une chaîne de réactions de synthèses, il est évidemment tentant de chercher à déterminer quelles sont les ou la réaction qui imposent leur vitesse à l'ensemble des échanges le long de la chaîne. On sait que, d'après une conception très largement répandue, cette recherche est légitime : il existerait dans toute chaîne de réactions une réaction maîtresse (« master reaction » des auteurs américains) plus lente que les autres, imposant grâce à cela sa propre vitesse à l'ensemble du processus. Les résultats que l'on vient d'exposer mettent en évidence une corrélation étroite entre le taux de croissance et l'activité des enzymes qui catalysent l'attaque des substrats. Sommes-nous autorisés à en conclure que le taux de croissance est en effet limité par une « master reaction » et que celle-ci n'est autre que la première de la chaîne ? Il convient d'être extrêmement prudent à cet égard. Il est difficile d'admettre au point de vue théorique que, dans un processus comme celui de la croissance, une réaction puisse jouer un rôle absolument prépondérant. On peut montrer (BURTON 1936) que la vitesse d'un processus complexe dépend à la fois de la vitesse de toutes les réactions de la chaîne, et de leurs constantes d'équilibre lorsque ce sont des réactions réversibles. Nous aurons à revenir là-dessus à propos des coefficients de température. Il faut noter d'autre part que le taux de croissance est toujours plus élevé dans le cas des milieux albumineux. Pourtant l'activité des enzymes catalysant l'attaque des substrats n'est pas plus grande dans ce cas. L'explication de ce taux de croissance élevé est alors toute différente : il doit tenir à ce qu'un certain nombre au moins de corps (acides aminés en particulier) présents dans le milieu sont directement assimilables et n'ont pas à être synthétisés. La chaîne des synthèses est alors plus courte.

On ne saurait donc conclure que l'attaque des substrats constitue une « master reaction » déterminant *entièrement* le taux de croissance. Mais il est certain qu'elle y contribue pour une part extrêmement importante.

TAUX DE CROISSANCE DANS LES MÉLANGES DE SUCRES.

Les données expriment très clairement que le taux de croissance n'est jamais, dans un mélange de sucres, supérieur à la valeur trouvée pour chaque constituant du mélange séparément. (Le chiffre de 1,28 trouvé pour la croissance *B. subtilis* sur glucose + saccharose, comparé à 1,21 pour le glucose seul, et 1,25 pour le saccharose seul, ne saurait en effet être considéré comme significatif puisque la différence est à peine de 2 %). Il semble que le taux de croissance sur le mélange soit intermédiaire entre les valeurs correspondant aux constituants, avec une tendance assez nette à se rapprocher de la valeur la plus élevée. Quoi qu'il en soit les taux de croissance maximum ne sont jamais, même partiellement, additifs.

Par conséquent, si le taux de croissance dépend en premier lieu de l'activité des mécanismes enzymatiques, ceux-ci ne paraissent pas pouvoir collaborer indépendamment les uns des autres aux synthèses. On ne doit pas en conclure à la non spécificité des enzymes bactériens. Celle-ci a été démontrée dans bien des cas (V. VIRTANEN, 1934).

Mais ces résultats paraissent indiquer l'existence d'un mécanisme de saturation commun à tous les enzymes attaquant une même série de corps. Encore une fois, d'ailleurs, ils se superposent entièrement aux résultats obtenus par la mesure directe de l'activité des enzymes. QUASTEL et WOOLDRIDGE (1928), étudiant la réduction du bleu de méthylène par des mélanges de sucres en présence de *B. coli*, ont montré que les temps de réduction sont sensiblement les mêmes avec les substrats isolés qu'avec les mélanges. Il n'y a pas lieu de rappeler les importantes conclusions tirées par QUASTEL de cette étude. Notons cependant que la mesure du taux de croissance permet d'en donner une confirmation, appuyée, la chose n'est peut-être pas négligeable, sur des expériences faites avec des cultures normales, en voie de prolifération active.

On peut conclure de tout ceci que, si le taux de croissance n'est pas exclusivement limité par l'activité des mécanismes enzymatiques, et ne peut par conséquent en constituer une mesure, ces mécanismes jouent cependant un rôle prépondérant dans sa détermination.

Résumé du chapitre IV.

1° L'étude du taux de croissance en fonction de la concentration de l'aliment limitant montre que cette relation, loin d'être linéaire comme l'ont supposé les théoriciens, doit être représentée par une courbe d'allure hyperbolique : le taux de croissance tend très rapidement vers une limite, et ne diminue que pour des valeurs très faibles de la concentration en aliments.

2° Cette limite est différente suivant la nature de l'aliment et varie même de façon importante suivant la nature du sucre constituant la source carbonée.

3° En présence d'un mélange de sucres, le taux de croissance limite n'est jamais supérieur au taux correspondant à chaque constituant du mélange.

4° Ces résultats se superposent entièrement à ceux que fournit la mesure de l'activité enzymatique. On doit en conclure que le taux de croissance est dans une large mesure, mais non uniquement, limité par ces mécanismes.



CHAPITRE V

Le rendement en fonction du taux de croissance.

Ration d'entretien et ration de croissance.

On peut, dans l'énergie absorbée par un organisme en voie de croissance, distinguer deux parties. L'une représente le travail de synthèse, nécessaire à l'élaboration des matériaux de construction de la cellule. Elle est liée à la croissance et s'annule lorsque le taux de croissance est nul. L'autre représente la dépense nécessaire au maintien de la structure de l'organisme, au travail d'organisation. Elle est indépendante de la croissance et doit exister du seul fait que l'organisme vit. Dans les cultures de microorganismes que nous étudions, la source carbonée constitue à la fois la seule source d'énergie et la source principale de matériaux de construction. On peut schématiser sous la forme suivante son utilisation :

Quantité totale d'aliment ternaire utilisé	{	1 ^o Fraction utilisée comme matériaux de construction	}	<i>Ration de croissance</i>
		2 ^o Fraction libérant l'énergie nécessaire à l'élaboration de ces matériaux (syn- thèses)		
		3 ^o Fraction libérant l'énergie nécessaire à l'entretien	}	<i>Ration d'en- retien</i>

Si l'on considère la croissance d'une culture dans un certain intervalle, la quantité d'aliment ternaire utilisée dans cet intervalle se répartit en deux fractions : l'une, la ration de croissance, n'est fonction que de l'accroissement de la culture pendant cet intervalle. L'autre, la ration d'entretien, est fonction à la fois de la densité de la culture et du temps. Il est évident que si le même accroissement est réalisé en un temps plus long, la fraction d'aliment utilisée pour l'entretien sera plus forte, alors que la fraction utilisée pour la crois-

sance restera la même. On se souvient que le rendement de la croissance a été défini comme :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Substance vivante formée}}{\text{Aliment ternaire utilisé}}$$

Le rendement défini de la sorte fait intervenir à la fois la ration d'entretien et la ration de croissance. Par conséquent, à moins que la ration d'entretien ne soit nulle, ce rendement doit être fonction du temps. On peut l'écrire en effet :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Substance vivante formée}}{\text{Ration d'entretien} + \text{Ration de croissance}}$$

et il est évident que lorsque le taux de croissance diminue, il doit également diminuer. La quantité totale d'aliment ternaire utilisée par unité de substance vivante formée *augmente* lorsque le taux de croissance *diminue*.

Cependant les résultats exposés dans les deux chapitres précédents montrent que si le *taux de croissance* baisse pour de faibles concentrations d'aliment, le *rendement* n'en demeure pas moins invariable. Par conséquent à l'approximation près de ces expériences, *tout se passe comme si* la totalité de l'aliment était utilisée pour la croissance, la ration d'entretien étant nulle. On ne doit pas oublier cependant que le taux de croissance ne baisse très sensiblement que pour des concentrations *très faibles* d'aliment. La croissance totale des cultures poussant sur de telles concentrations est elle-même très petite et l'erreur commise dans son évaluation est grande. Lorsque la concentration initiale est assez forte pour que la croissance totale soit mesurable avec précision, les variations du taux de croissance deviennent négligeables, la limite étant pratiquement atteinte. C'est pourquoi les expériences en question ne permettent pas d'évaluer l'ordre de grandeur réel de la ration d'entretien. Elles nous permettent simplement d'affirmer que ses *variations* sont négligeables. Il y aurait cependant grand intérêt à établir le bilan détaillé de l'utilisation de l'aliment ternaire dans les cultures de microorganismes et pour cela à évaluer l'importance relative de la ration d'entretien et de la ration de croissance. On pourrait espérer y parvenir en modifiant expérimentalement le taux de croissance et en notant les variations concomitantes du rendement. Encore faut-il être certain que le moyen employé pour provoquer le ralentissement ou l'accélération du taux de croissance ne puisse *par lui-même*

influencer le rendement des réactions de synthèses. Il est évidemment bien difficile, sinon impossible, d'être certain que ces conditions sont remplies.

Cette évaluation a cependant été tentée par TERROINE et WURMSER (1922). Ces auteurs ont déduit de leurs expériences sur l'*Aspergillus* que la formation d'un gramme de mycelium exige 2 gr. 2 de glucose et que l'entretien de 1 gr. de mycelium absorbe 0 gr. 011 de glucose par heure. Pour intéressant que soit cet essai, il est difficile de savoir dans quelle mesure les chiffres donnés s'approchent de la réalité. Les variations du taux de croissance ont en effet été obtenues par des variations de pH. Or le taux de croissance des cultures d'*Aspergillus* ne baisse de façon sensible que dans une zone de pH toute proche de celle au delà de laquelle la croissance est impossible. Les expériences de TERROINE et WURMSER ont consisté à comparer le rendement de cultures à pH normaux, et taux de croissance normal, à celui de cultures ralenties, à pH 1,2, alors qu'à pH 1 environ, toute croissance est impossible. Il est vraisemblable, pour ne pas dire probable, que dans de telles conditions, l'abaissement du pH n'agit pas seulement sur le taux de croissance. Le rendement des synthèses peut en être *directement* modifié, ce qui enlèverait toute signification aux valeurs calculées par TERROINE et WURMSER. C'est pourquoi il a paru intéressant d'essayer de reprendre cette détermination avec des cultures bactériennes, qui permettent, comme nous l'avons vu, une mesure extrêmement précise du rendement.

Le crédit qui peut être accordé à une telle évaluation dépend avant tout de la méthode employée pour provoquer les variations du taux de croissance. On ne saurait évidemment se fier à des variations de température. Tout porte à croire que si les variations de température peuvent influencer le rendement global par l'intermédiaire des variations du taux de croissance, elles peuvent aussi avoir une influence *directe* sur le rendement des synthèses. Nous verrons que cette hypothèse se vérifie en effet par l'expérience. L'emploi d'agents plus ou moins toxiques est également interdit. Enfin les expériences précédentes ont montré que les variations de concentration des aliments sont insuffisantes, tout au moins entre les limites permettant une mesure précise du rendement.

Nous avons vu (Chap. II) que le simple fait de ne pas agiter les fioles contenant les cultures, limitant la diffusion de l'oxygène dans le milieu, aboutit à un ralentissement du taux de croissance qui peut

être considérable. C'est en définitive le moyen qui a été adopté. Il n'est certes pas exempt de toute critique. Il est fort possible qu'en présence de faibles tensions d'oxygène le rendement subisse une baisse apparente, conséquence de l'anaérobiose partielle et non de la modification du rapport de la ration d'entretien à la ration de croissance.

On peut donc craindre que le moyen employé ne fournisse des valeurs trop élevées de la ration d'entretien. Nous verrons de quel poids sont ces objections après l'exposé des résultats expérimentaux.

Résultats expérimentaux.

Les expériences consistent dans la comparaison de la croissance d'une culture normalement aérée par agitation au sein du thermos-tat et d'une culture identique mais immobile. La diffusion de l'oxy-

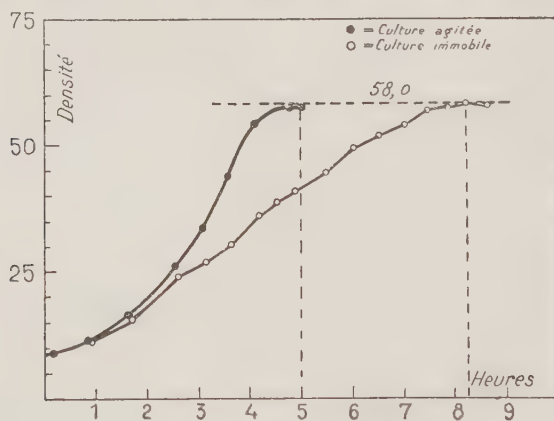


FIG. 19. — Croissance de deux cultures de *B. coli* en milieu synthétique + lactate d'ammonium. L'une des cultures est agitée, l'autre est immobile et croît plus lentement. Toutes deux parviennent cependant au même maximum.

gène dans la seconde culture est alors suffisamment lente pour que le taux de croissance diminue dans des proportions importantes. Cette culture est agitée cependant avant chaque prélèvement, afin d'assurer son homogénéité. Cette nécessité limite dans une certaine mesure le ralentissement que l'on peut obtenir par ce procédé. J'ai réalisé des expériences de ce type avec divers milieux, naturels et synthétiques. Les sucres doivent être écartés comme source carbo-

née : en effet dans les cultures non agitées le maximum baisse dans de telles proportions que cet effet ne saurait être attribué uniquement à la diminution du taux de croissance. Il s'agit évidemment d'une utilisation incomplète de l'aliment carboné due à une anaérobiose partielle. En milieu naturel (bouillon de cervelle de veau) et en milieu synthétique + lactate, on n'observe rien de semblable, comme le montre le tableau suivant, exprimant la croissance de quatre cultures de *B. coli*.

TABLEAU XXIV.
*Comparaison de la croissance de B. coli
en cultures agitées et non agitées.*

Milieu synthétique S + lactate d'ammonium à 0,2 p. 1.000				Bouillon de cervelle de veau			
Culture agitée		Culture non agitée		Culture agitée		Culture non agitée	
Heure	Densité	Heure	Densité	Heure	Densité	Heure	Densité
0	9	0,0	9,0	0,0	1,0	0,0	1,0
0,85	11,5	0,90	11,3	1,45	1,5	1,50	1,5
1,65	16,6	1,70	15,6	2,50	3,2	2,55	3,2
2,55	26,0	2,60	24,2	3,50	11,5	3,55	11,5
3,10	33,7	3,15	27,0	4,25	17,3	4,35	23,3
3,60	44,0	3,65	30,5	5,15	55,0	5,35	34,0
4,15	54,3	4,20	36,3	6,35	70,0	6,55	45,5
4,50	57,0	4,55	38,7	7,35	79,5	7,55	57,5
4,85	57,5	4,90	41,0	8,75	83,5	8,85	59,0
5,10	57,5	5,50	44,7	9,80	84,5	10,0	90,0
		6,05	49,5	10,30	84,5	11,25	79,7
		6,55	52,0			12,50	82,0
		7,05	54,2			13,45	83,0
		7,50	57,0			14,00	84,0
		7,90	57,5			14,65	84,3
		8,25	58,3				
		8,65	58,0				

On voit que, en milieu synthétique, le maximum est atteint plus de trois heures plus tard dans la culture immobile que dans la culture agitée. En milieu naturel le retard est de quatre heures. Les croissances totales sont pratiquement les mêmes, les différences étant inférieures aux erreurs d'expérience. Les figures 19 et 20 qui objectivent ces résultats montrent aussi que la croissance des cultures immobiles est assez irrégulière. Nous avons déjà noté que ces irrégularités devaient être attribuées aux apports variables d'oxy-

gène lors de l'agitation qui précède chaque prélèvement. Elles sont du reste sans importance pour ce qui nous préoccupe.

Ces expériences ont été répétées à plusieurs reprises, mais il paraît inutile d'en donner d'autres exemples, les résultats ayant constam-

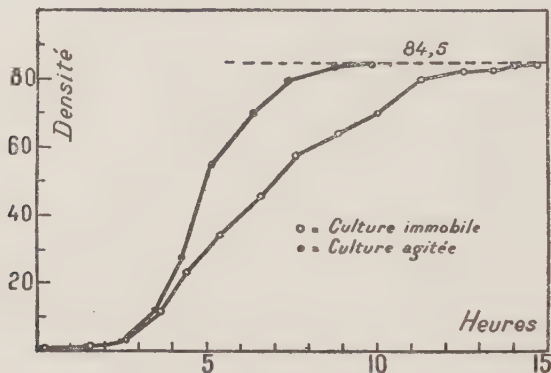


FIG. 20. — Croissance de deux cultures de *B. coli* en bouillon de cervelle de veau. On voit que la culture à croissance ralentie parvient au même maximum que la culture à croissance normale.

ment été négatifs, en ce sens que la croissance totale des cultures « ralenties » et des cultures normales a toujours été la même, aux erreurs près.

Discussion.

Les expériences qui viennent d'être rapportées ne permettent donc pas de mettre en évidence une dépense d'aliment ternaire qui soit *indépendante de la croissance*. Reste à savoir quelle est la portée exacte de ce résultat négatif, et s'il est possible d'en tirer des conclusions, ou au moins des indications, sur l'ordre de grandeur de la ration d'entretien.

Avant de passer à la critique du principe même de cette expérience, il pourra être intéressant de la supposer correcte et de calculer quelle serait, dans ce cas, la *valeur maximum* de la ration d'entretien qui serait compatible avec les résultats expérimentaux. En admettant que l'erreur absolue dans la détermination de la densité soit de 0,5 unités, erreur qui n'est certainement dépassée, on voit qu'en milieu synthétique (fig. 19) la croissance totale de la culture agitée pourrait être au *maximum* 47,0 et celle de la culture non agi-

tée, au *minimum* 46,8. Proposons-nous, à l'aide de ces deux chiffres de calculer la valeur des coefficients d'entretien et de croissance.

La quantité d'aliment utilisée pour la croissance est directement proportionnelle à l'accroissement on a donc :

$$C_A = K_A (x - x_o) \quad (1)$$

C_A étant la ration de croissance K_A le coefficient de croissance. La ration d'entretien est proportionnelle à la fois à la quantité de matière vivante et au temps. Si l'équation de croissance est :

$$x = f(t)$$

la quantité d'aliment dépensée pour l'entretien est évidemment :

$$C_E = K_E \int_0^t f(t) dt \quad (2)$$

K_E étant le coefficient d'entretien, et C_E la ration d'entretien.

Lorsque la croissance est arrivée à son terme, la quantité initiale d'aliment est complètement épuisée. On a alors, C_o étant cette quantité :

$$C_o = C_A + C_E$$

En remplaçant C_A et C_E par leurs valeurs tirées de (1) et (2) on a :

$$C_o = K_A (x - x_o) + K_E \int_0^t f(t) dt$$

Il n'est pas indispensable pour effectuer le calcul de connaître la forme de la relation $x = f(t)$. Il suffira d'évaluer graphiquement l'aire définie par la courbe de croissance entre le temps O et le temps correspondant au maximum (fig. 19). Il y a évidemment une certaine incertitude dans la détermination de ce dernier temps. Mais il ne s'agit ici que d'évaluer un ordre de grandeur maximum. Les aires définies par les deux courbes correspondent à environ 15 unités densités-temps pour la culture agitée, et à 26 unités pour la culture non agitée. En se basant sur ces chiffres, on trouve que le rapport des deux coefficients est d'environ :

$$\frac{K_A}{K_E} = 550$$

En d'autres termes, la quantité d'aliment ternaire nécessaire à l'entretien, pendant une heure, d'une unité de substance vivante est

au moins 550 fois plus petite que la quantité nécessaire à la synthèse de cette substance vivante. Insistons sur le fait qu'il ne s'agit pas là d'une valeur probable, mais de la *valeur maximum compatible avec les données de l'expérience*. Nous savons que la formation d'un gramme de substance sèche exige environ 3 gr. d'aliment ternaïre. L'entretien pendant une heure de cette même quantité emploierait au maximum 5 milligrammes environ d'aliment ternaïre.

Telle serait du moins la conclusion qu'il serait permis de tirer de cette expérience, si celle-ci pouvait être considérée comme absolument correcte au point de vue méthodique. Or, au principe même des expériences en question, on peut faire deux objections importantes.

1^o Tout d'abord il n'est pas permis d'affirmer que le moyen employé pour provoquer le ralentissement du taux de croissance ne puisse pas provoquer *directement* une variation du rendement. Nous avons déjà noté que l'on pouvait, *a priori*, craindre que l'anaérobiose partielle ne s'accompagne de combustions incomplètes, et par conséquent d'une *baisse du rendement*. Cette objection possible n'a pas à intervenir en fait puisque la baisse en question ne se produit pas (1). Mais il n'est pas interdit de faire une hypothèse inverse, de supposer qu'en présence de faibles tensions d'oxygène l'équilibre ou la nature des réactions de synthèse, ou des réactions énergétiques, soit modifié dans un sens tel que le rendement de la croissance soit augmenté. Il pourrait se faire que cette augmentation compensât à peu près exactement la baisse de rendement corrélative de la diminution du taux de croissance, ce qui expliquerait les résultats obtenus.

2^o On peut imaginer également qu'au cours de la croissance il apparaît parmi les déchets du métabolisme carboné un corps non susceptible d'être utilisé pour les synthèses, capable cependant de fonctionner comme source énergétique. Si un tel corps apparaissait en quantité suffisante, il pourrait en effet fonctionner comme une sorte de source occulte d'énergie.

Quoique ces deux objections soient hypothétiques, et fassent intervenir des éventualités peu probables peut-être, elles doivent

(1) Tout au moins quand la source carbonée est représentée par un lactate, inutilisable en anaérobiose.

être prises en considération. Elles ne pourraient être éprouvées, et éventuellement écartées, que par des mesures d'ordre énergétique, c'est-à-dire calorimétriques. Il est malheureusement difficile d'espérer que de telles mesures puissent atteindre une précision suffisante, étant donné les faibles quantités de matière vivante récoltées dans de telles expériences. En tous cas la mesure du rendement énergétique dans les cultures bactériennes exigerait une mise au point technique considérable que je n'ai pu entreprendre encore.

En l'absence de ces données qui seules seraient susceptibles d'apporter une réponse définitive à la question que nous nous sommes posées dans ce chapitre, quelles conclusions ou quelles indications peut-on tirer des expériences qui viennent d'être décrites ?

Rappelons tout d'abord que nous nous trouvons en présence de trois résultats expérimentaux différents, mais dont les conclusions sont, ou du moins paraissent, convergentes.

a) Lorsque la concentration de l'aliment carboné est faible, le taux de croissance baisse sans que pour cela le rendement diminue d'une façon sensible (Comparaison des résultats exposés dans les chapitres III et IV).

b) En présence de faibles tensions d'oxygène, le taux de croissance diminue de façon très appréciable, mais le rendement matériel, tout au moins le rendement apparent, n'est pas modifié (expériences décrites dans ce chapitre).

c) Il semble qu'il n'existe pas de concentration d'aliment ternaire, si faible qu'elle soit, qui ne permette la croissance ; autrement dit la concentration d'entretien est nulle (expériences décrites au chapitre III).

L'interprétation la plus simple et la plus directe de ces faits est évidemment que dans une culture bactérienne en voie de croissance il est impossible de mettre en évidence une dépense ou un besoin en aliment carboné qui soit réellement *indépendant de la croissance*.

Il est difficile d'aller plus loin ; et on doit en particulier se garder de toute conclusion d'ordre énergétique, seul le bilan matériel ayant été pris en considération. Il n'est pas interdit cependant de faire des hypothèses et il est permis de se demander si ces résultats ne signifient pas qu'en fait, dans une culture bactérienne en voie de croissance active, il n'existe pas de distinction réelle entre énergie d'entretien et énergie de synthèses, et que cette distinction, si importante

pour la physiologie des êtres d'organisation plus élevée, n'a plus guère de raison d'être lorsqu'il s'agit des organismes les plus inférieurs.

Si les résultats qui viennent d'être exposés ne permettent pas de répondre à cette question, on ne peut douter en tous cas qu'ils la posent.

Quoi qu'il en soit, et pour nous en tenir strictement aux faits, nous pouvons conclure que *tout se passe comme si* le rendement matériel de la croissance des cultures bactériennes était indépendant du taux de croissance, tout au moins lorsque les variations du taux sont dues à des variations de concentration de l'aliment carboné ou de l'oxygène.

Résumé du chapitre V.

On peut montrer *a priori*, que, dans le cas où la part des dépenses d'entretien serait sensible au cours de la croissance des cultures bactériennes, le rendement brut de la croissance aux dépens de l'aliment carboné devrait baisser lorsque le taux de croissance diminue.

Cet effet, cependant, ne peut être mis expérimentalement en évidence, tout au moins lorsque les variations du taux de croissance sont provoquées par des variations de concentration de l'aliment limitant, ou de tension de l'oxygène.

La signification de ces résultats négatifs est discutée.



CHAPITRE VI

Le rendement au cours de la croissance.

Les expériences rapportées dans les chapitres précédents montrent que d'une manière générale le rendement matériel de la croissance est indépendant de son taux.

On doit cependant se demander si le rendement est réellement constant au cours de la croissance, ou si au contraire il est sujet à des variations qui exprimeraient le « vieillissement » des cultures et les modifications de leurs constantes physiologiques. On sait que la croissance des cultures bactériennes a souvent été comparée à celle des individus d'espèces supérieures, et qu'on a voulu y trouver les mêmes signes de jeunesse, les mêmes symptômes de vieillissement. Cette analogie assez douteuse contient peut-être une part de vérité. Elle ne paraît pas d'ailleurs manquer de supports expérimentaux. Parmi d'autres travaux, il faut citer en premier lieu ceux d'un groupe de bactériologistes américains qui se sont efforcés de démontrer que la notion d'âge physiologique, appliquée aux cultures bactériennes, répond en effet à des modifications profondes des propriétés des organismes au cours de la croissance des cultures. Celle-ci comporterait une véritable « phase d'adolescence », correspondant à la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle. Cette phase d'adolescence serait caractérisée par une intensification considérable de tous les processus métaboliques : consommation d'oxygène, production de CO_2 , fermentation (MARTIN 1932, BAYNE JONES et RHEES 1929, WALKER et WINSLOW 1932, WALKER, WINSLOW, HUNTINGTON et MOONEY 1934, HUNTINGTON et WINSLOW 1937).

Si ces résultats signifient réellement que les propriétés physiologiques des organismes se modifient au cours des diverses phases de la croissance, il n'est pas douteux que ces modifications doivent

s'accompagner de variations du rendement, que l'on peut considérer comme le paramètre fondamental de la croissance. La mesure du rendement au cours de la croissance permettra donc de contrôler ces interprétations. Ces mesures s'imposent d'autre part comme contrôle des expériences rapportées au chapitre III. On sait que le rendement y a été évalué en mesurant la « croissance totale » des cultures. Si le rendement réel variait au cours de la croissance, cette évaluation ne correspondrait plus qu'à un rendement moyen, résumant les valeurs successives prises pendant les diverses phases de la croissance. Il importe d'être fixé sur ce point.

Les expériences exposées dans ce chapitre ont donc pour but de vérifier si le rendement de la croissance aux dépens de l'aliment limitant, en l'espèce l'aliment ternaire, varie ou non au cours de la croissance d'une même culture. Il s'agit par conséquent de suivre à la fois l'accroissement de la culture et la disparition de l'aliment carboné.

Résultats expérimentaux.

Technique des dosages. — Les expériences ont été conduites dans les conditions habituelles. Les prélèvements, de 25 cc. environ étaient divisés en deux fractions. L'une était utilisée pour les mesures de densité optique. Sur l'autre, de 20 cc., on pratiquait le dosage de l'aliment ternaire. Toutes les cultures sont faites en milieu synthétique *S*, additionné d'un sucre réducteur. On doit rechercher le maximum de précision dans l'évaluation de la densité comme dans le dosage du sucre, puisqu'il s'agit de comparer les résultats de ces deux mesures et que les erreurs pourraient, en s'ajoutant, devenir considérables.

Après plusieurs essais on a adopté une technique basée sur la méthode au iodo-mercure de BEAUDOUIN et LEWIN, qui a paru donner des résultats particulièrement fidèles et précis. Les opérations successives sont les suivantes :

- 1° A 20 cc. de culture on ajoute 1 cc. de réactif iodo-mercure (1) ;
- 2° Centrifugation très énergique (9.000 tours pendant 5') ;
- 3° Ajouter 2 cc. de soude *N* à 20 cc. du liquide centrifugé ;

(1) Pour la composition des solutions utilisées voir DENIGÈS, CHELLE et LABAT, 1930, t. 2, p. 622.

4° Bain-marie bouillant pendant 1'30" ;

5° Refroidir rapidement et ajouter 3 cc. de la solution titrée d'iodate, mesurés avec la plus grande précision.

6° Dosage de l'excès d'iode par le thiosulfate *N*/100.

Ce mode opératoire appelle quelques remarques : *a*) on observe que le dosage ne comporte pas de défécation. Celle-ci s'avère inutile, les nombreux défécants employés n'ayant jamais provoqué de précipitation. D'ailleurs l'inutilité de la défécation a été signalée par JACQUET (1937) pour le dosage des sucres dans les cultures d'*Aspergillus*. MAGGEE et SMITH (1930), KLEMME et POE (1936), après avoir comparé plusieurs méthodes de dosage de sucres dans les cultures bactériennes arrivent à la même conclusion. *b*) C'est à dessein que le réactif iodo-mercurique est ajouté *avant* la centrifugation. On obtient ainsi un culot beaucoup plus dense et la décantation est alors facile.

Résultats. — Ils se rapportent à la croissance de *B. coli* en milieu synthétique, sur trois sucres dont un pentose (xylose), un hexose (glucose) et un dissaccharide (lactose). La concentration initiale était de 200 mg. par litre environ. Les valeurs relatives entrant seules en ligne de compte, les tableaux expriment les résultats en unités de densité optique et en cc. de thiosulfate. La quatrième colonne donne le nombre de cc. de thiosulfate utilisés ; la cinquième, la différence entre ce nombre et le nombre de cc. nécessaires lorsque le milieu ne contient pas de sucre. Ce dernier chiffre correspond donc à la quantité de sucre *restant dans le milieu* à l'instant considéré.

TABEAU XXV.

**Consommation de l'aliment ternaire
au cours de la croissance d'une culture de *B. coli*
sur milieu *S* + glucose.**

Heure	Densité de la culture	Accroissement de densité	Cc. thiosulfate utilisés	Cc. thiosulfate correspondant au sucre restant
0,0	12,7	0,0	6,30	8,20
0,57	19,5	6,8	7,68	6,82
1,00	27,1	14,4	8,85	5,65
1,37	37,8	25,1	10,80	3,70
1,60	46,8	34,1	12,20	2,30
1,80	55,7	43,0	—	—
2,20	60,5	47,8	14,30	0,20
2,50	61,5	48,8	—	—
2,75	61,4	48,7	—	—

TABLEAU XXVI.

*Consommation de l'aliment ternaire
au cours de la croissance d'une culture de B. coli
sur milieu S + xylose.*

Heure	Densité de la culture	Accroissement de densité	Cc. thiosulfate utilisés	Cc. thiosulfate correspondant au sucre restant
0,10	4,8	0,00	—	—
1,00	7,8	3,00	6,45	8,05
1,55	10,5	5,7	—	—
2,05	15,0	10,2	7,70	6,80
2,57	21,5	16,7	8,47	6,03
3,00	29,2	24,4	9,70	4,80
3,50	41,5	36,7	11,60	2,90
3,90	55,0	50,2	14,0	0,50
4,30	58,0	53,2	14,35	0,15
4,75	58,0	53,2	—	—

TABLEAU XXVII.

*Consommation de l'aliment ternaire
au cours de la croissance d'une culture de B. coli
sur milieu S + lactose.*

Heure	Densité de la culture	Accroissement de densité	Cc. thiosulfate utilisés	Cc. thiosulfate correspondant au sucre restant
0,0	6,0	0,0	8,20	6,30
0,76	8,2	2,2	—	—
1,45	13,5	7,5	8,75	5,75
2,0	19,8	13,8	9,68	4,82
2,65	31,5	25,5	10,72	3,78
3,10	46,5	40,5	12,70	1,80
3,50	57,5	51,5	13,40	1,10
3,92	63,0	57,0	14,25	0,25
4,55	65,0	59,0	14,50	0,00
4,75	65,1	59,1	—	—

les figures 21, 22 et 23 expriment chacune : a) la croissance de la culture ; b) la disparition du sucre en fonction du temps ; c) la disparition du sucre en fonction de l'accroissement de la culture.

Discussion des résultats.

L'inspection des graphiques, en particulier de ceux qui expriment la disparition de l'aliment ternaire en fonction de la croissance

de la culture, ne révèle aucune variation du rendement au cours de l'évolution de la croissance. Il n'y a, en particulier, aucune variation perceptible pendant la phase de début, c'est-à-dire pendant la phase de « jeunesse physiologique » que de nombreux auteurs croient avoir mise en évidence. En ce qui concerne la phase finale

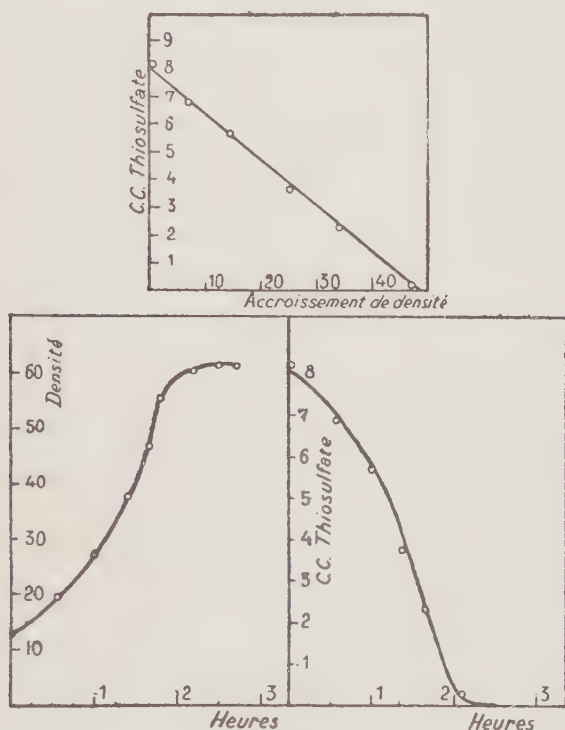


FIG. 21. — *B. coli* en milieu synthétique + glucose. A gauche, croissance de la culture, à droite consommation du sucre en fonction du temps ; en haut consommation du sucre en fonction de l'accroissement de la culture, (concentration du sucre exprimées en cc. de thiosulfate).

de la croissance, on ne constate pas non plus de variation apparente, par conséquent pas de « vieillissement » sensible. On ne saurait cependant accorder beaucoup de « poids » aux dosages finaux, l'erreur relative étant alors considérable. Aussi la meilleure démonstration du fait que le rendement ne varie pas sensiblement entre le début et la fin de la croissance est-elle la suivante : on constate dans tous les cas que la pente de la droite représentant la disparition du sucre en fonction de l'accroissement de la culture est telle que

celle-ci rencontre l'axe des abscisses en un point qui correspond précisément à la croissance totale de la culture. Il ne pourrait en être ainsi si le rendement était au début, ne fût-ce que légèrement, inférieur ou supérieur à ce qu'il est à la fin.

Il est clair, au contraire, que la consommation du sucre est cons-

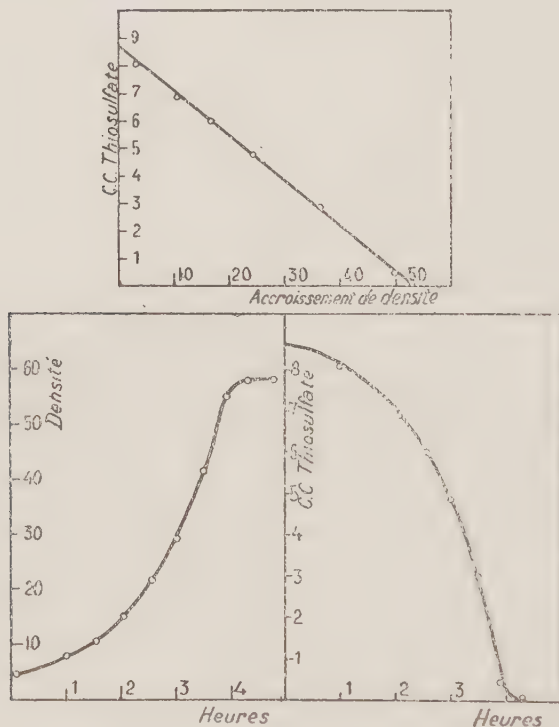


FIG. 22. — *B. coli* en milieu synthétique + xylose. A gauche, croissance de la culture, à droite consommation du sucre en fonction du temps, en haut consommation du sucre en fonction de l'accroissement de la culture (concentration du sucre exprimée en cc. de thiosulfate).

tamment proportionnelle à l'accroissement de la culture, que le rendement de la croissance aux dépens de l'aliment ternaire est invariable.

Reste à savoir comment on peut concilier ces constatations avec celles des auteurs qui ont mis en évidence des variations considérables des propriétés physiologiques au cours de la croissance. Ainsi WALKER et WINSLOW (1932) ont trouvé un accroissement très important de la production de CO_2 par les cultures de *B. coli* « at the close of the lag phase », MARTIN (1932) a obtenu des résultats analogues.

Un accroissement considérable de la production de chaleur pendant la même période (fin de la phase de latence, et début de la phase exponentielle) a été mis en évidence par les expériences de BAYNE JONES et RHEES (1929). On pourrait citer encore beaucoup d'exemples analogues. Tout cela paraît indiquer que les cultures bactériennes, tout comme les êtres supérieurs, passent par des « crises » physiologiques qui marquent leur croissance, et modifient profon-

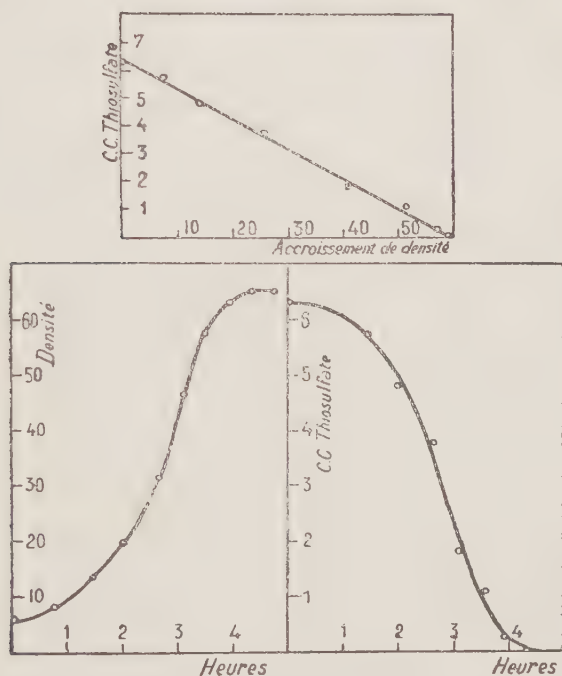


Fig. 23. — *B. coli* sur milieu synthétique + lactose. A gauche, croissance de la culture, à droite consommation du sucre en fonction du temps, en haut, consommation du sucre en fonction de l'accroissement de la culture (concentration du sucre exprimée en cc. de thiosulfate).

dément leurs propriétés. Il est au premier abord surprenant de constater que la mesure du rendement au cours de la croissance ne révèle rien de semblable, au contraire.

Cette contradiction n'est qu'apparente. Dans toutes les expériences que nous venons de citer, les mesures de densité ont été faites par *numération des cellules*. Or on sait (V. p. 20) que la taille des cellules bactériennes se modifie au cours de la croissance d'une même culture, et passe par un maximum précisément au début de la phase

exponentielle. Il n'est guère douteux que c'est à ce phénomène que sont dus les résultats que l'on vient de citer. En réalité, lorsque l'on tient compte de la taille des cellules, et que par conséquent on rapporte les chiffres expérimentaux, non au nombre de bactéries, mais à la quantité de substance vivante, l'apparent accroissement d'activité au début de la phase exponentielle disparaît *entièrement*. C'est ce qu'ont montré en particulier HERSCHEY et BRONFENBRENNER (1938) et ce qui ressort également des résultats de HUNTINGTON et WINSLOW (1937).

L'invariabilité du rendement démontre que les propriétés physiologiques essentielles demeurent remarquablement constantes au cours de la croissance et qu'il n'y a aucune commune mesure entre la croissance d'une culture bactérienne et celle des êtres pluricellulaires. La première est uniquement limitée par les circonstances extérieures, les conditions de milieu, l'autre est soumise à des conditions internes et à des limites indépendantes des circonstances extérieures. Rien ne justifie les expressions de « jeunesse » ou de « vieillesse » appliquées aux cultures bactériennes. Ces vagues analogies ne peuvent conduire qu'à des interprétations erronées des phénomènes. On pourrait en citer maints exemples tirés de la littérature relative à la croissance des bactéries.

D'autre part, les expériences exposées dans ce chapitre permettent d'affirmer que la croissance ne s'arrête que lorsque l'aliment ternaire est *totalemt épuisé*. Elles constituent donc une confirmation directe des conclusions que l'on peut tirer de l'étude de la croissance totale en fonction de la concentration initiale (chapitre III), en particulier en ce qui concerne la « concentration d'entretien » et le fait que celle-ci doit être nulle ou négligeable. Il est clair que si la concentration d'entretien n'était pas nulle, la droite exprimant la disparition du sucre en fonction de l'accroissement de la culture rencontrerait l'axe des abscisses en un point qui se trouverait *au delà* de celui qui correspond à la croissance totale.

D'une manière générale, ces résultats démontrent que la croissance totale constitue bien une mesure du rendement réel.

Résumé du chapitre VI.

Le dosage de l'aliment ternaire pendant la croissance démontre que le rendement est invariable. Aucun signe de « jeunesse » ou de « vieillissement » des cultures ne se manifeste donc dans cette propriété physiologique essentielle.

Les dosages indiquent en outre que, dans les conditions de ces expériences, la croissance ne s'arrête qu'une fois l'aliment ternaire totalement épuisé, ce qui confirme les résultats exposés au chapitre III.



CHAPITRE VII

Les coefficients de température des constantes de croissance.

On trouvera dans ce chapitre des données sur les variations avec la température des deux paramètres essentiels de la croissance, le rendement et le taux. Ces expériences ont été entreprises dans l'espoir qu'elles pourraient jeter quelque lumière sur la nature des réactions dont dépend la valeur de ces deux constantes.

En ce qui concerne le rendement, il semble qu'on ignore jusqu'ici à peu près complètement dans quelle mesure il est affecté par la température, et même dans quel sens il varie avec la température. Cette absence de données expérimentales ne saurait surprendre, puisque le rendement de la croissance des bactéries n'a fait jusqu'ici l'objet que d'un très petit nombre de travaux. Quelques auteurs, parmi lesquels il faut citer principalement GRAHAM SMITH (1920), ont déterminé le maximum atteint par des cultures bactériennes en fonction de la température. GRAHAM SMITH a constaté que la croissance totale était plus considérable à basse température. Malheureusement, ici comme dans bien d'autres cas, la nature des facteurs limitants n'était pas connue avec certitude. Il semble pourtant que dans les expériences de GRAHAM SMITH, la croissance était limitée, au moins partiellement, par l'épuisement du milieu. Ses résultats indiquent donc probablement que le rendement varie avec la température et qu'il baisse lorsque celle-ci s'élève, au moins entre certaines limites. En revanche, TERROINE et WURMSER (1922) ont constaté que chez les moisissures (*Aspergillus niger*), le rendement ne variait pas sensiblement avec la température. La question reste donc ouverte, et mérite d'être posée.

En ce qui concerne le taux de croissance on possède des données beaucoup plus nombreuses. Rappelons que le premier travail impor-

tant sur la croissance des cultures bactériennes est celui de Max MULLER (1895) qui avait pour but essentiel d'étudier l'influence des températures fébriles. BARBER (1909) et LANE CLAYTON (1909) ont étudié le taux de croissance du Coli-bacille et de quelques autres espèces en fonction de la température. On pourrait encore mentionner beaucoup d'autres données plus ou moins éparses dans divers travaux. Ces résultats suffisent à montrer que, comme tout autre processus biologique, le taux de croissance varie avec la température suivant la règle de VANT'HOFF, jusqu'à un maximum qui se tient le plus souvent aux environs de 37°. D'après les résultats de BARBER le Q_{10} serait aux environs de 2 entre 20 et 30 degrés. Les conditions dans lesquelles ont été faites ces expériences déjà anciennes ne permettent guère de savoir si le taux de croissance mesuré correspond effectivement au taux de croissance maximum, ou si au contraire d'autres facteurs ne contribuent pas à le limiter. En outre elles ne comportent pas de comparaisons précises entre milieux différents. Les auteurs précédents ont employé des milieux naturels.

On peut espérer parvenir à des conclusions plus précises en opérant en milieu synthétique, et en présence de différentes sources carbonées. Nous avons vu que si le taux de croissance tend vers une limite lorsque la concentration de l'aliment ternaire augmente, cette limite *n'est pas la même* suivant la nature de cet aliment. Il est évidemment nécessaire de compléter ces résultats en recherchant si le coefficient de température du taux de croissance est, ou n'est pas, le même suivant la nature de la source carbonée. Pour caractériser ces coefficients de température, on peut se contenter d'appliquer la règle de VANT'HOFF et de déterminer le Q_{10} . Le Q_{10} cependant est un moyen assez imparfait de caractériser un processus, puisque ce n'est pas une quantité constante, et qu'il varie avec la température. Dans un très grand nombre de cas, signalés en particulier par CROZIER (1924 et suiv.), il semble que l'on puisse appliquer à des processus biologiques l'équation d'ARRHÉNIUS.

Cette équation est généralement employée sous la forme :

$$K_2 = K_1 e^{\frac{E}{2} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)} \quad (1)$$

K_1 et K_2 étant les vitesses du processus étudié aux températures absolues T_1 et T_2 . La constante E a été désignée par CROZIER sous le nom de « caractéristique de température » pour la distinguer du

Q_{10} , généralement appelé « coefficient de température ». On démontre que cette équation est applicable aux réactions irréversibles de premier ordre. Son application aux processus biologiques est évidemment purement empirique. Pour CROZIER cependant et pour tout un groupe de physiologistes américains, le fait que cette équation soit applicable serait dû à ce que la vitesse d'un très grand nombre de processus biologiques serait réglée par une seule réaction (master reaction), la plus lente de la chaîne, qui imposerait sa « caractéristique de température » à l'ensemble du processus. CROZIER et ses collaborateurs ont même cherché dans quelle mesure la valeur de cette constante pourrait constituer une indication quant à la nature de cette « réaction maîtresse » : E représenterait la valeur de l'énergie d'activation du catalyseur de la réaction en question, et cette valeur pourrait caractériser ce catalyseur. Enfin CROZIER et ses collaborateurs ont montré que très souvent la valeur de E subissait une variation brusque aux alentours de certaines « températures critiques ». Ces variations brusques devraient être interprétées comme indiquant un changement de « master reaction ». Ces conceptions ont été vivement critiquées et nous aurons l'occasion de revenir sur ces critiques. Quoi qu'il en soit, l'équation (1) a pu être appliquée avec succès dans un très grand nombre de cas et son utilité comme relation empirique est certaine. Il est vraisemblable qu'elle doit pouvoir exprimer les variations du taux de croissance des bactéries en fonction de la température et dans ce cas on pourra utiliser la constante E comme caractéristique. Il sera particulièrement intéressant de rechercher s'il existe pour les processus de croissance des bactéries des « températures critiques » telles que CROZIER et ses élèves en ont signalées dans beaucoup de cas. Au total, les expériences qui suivent ont pour objet d'étudier :

1° Si le rendement de la croissance en présence de différentes sources ternaires varie avec la température.

2° Si la caractéristique de température du taux de croissance est différente suivant la source carbonée offerte.

Résultats expérimentaux.

Les expériences, faites dans les conditions habituelles, concernant la croissance de *B. coli* en milieu synthétique S , additionné d'une source ternaire (150 mg. par litre). Une série d'expériences fut con-

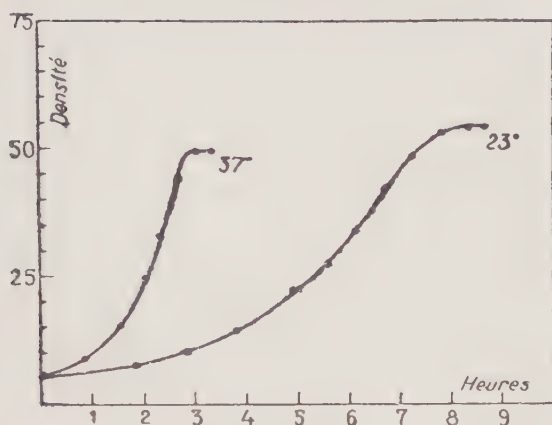


FIG. 24. — Croissance de *B. coli*, en milieu synthétique glucosé, à 23 et à 37 degrés.

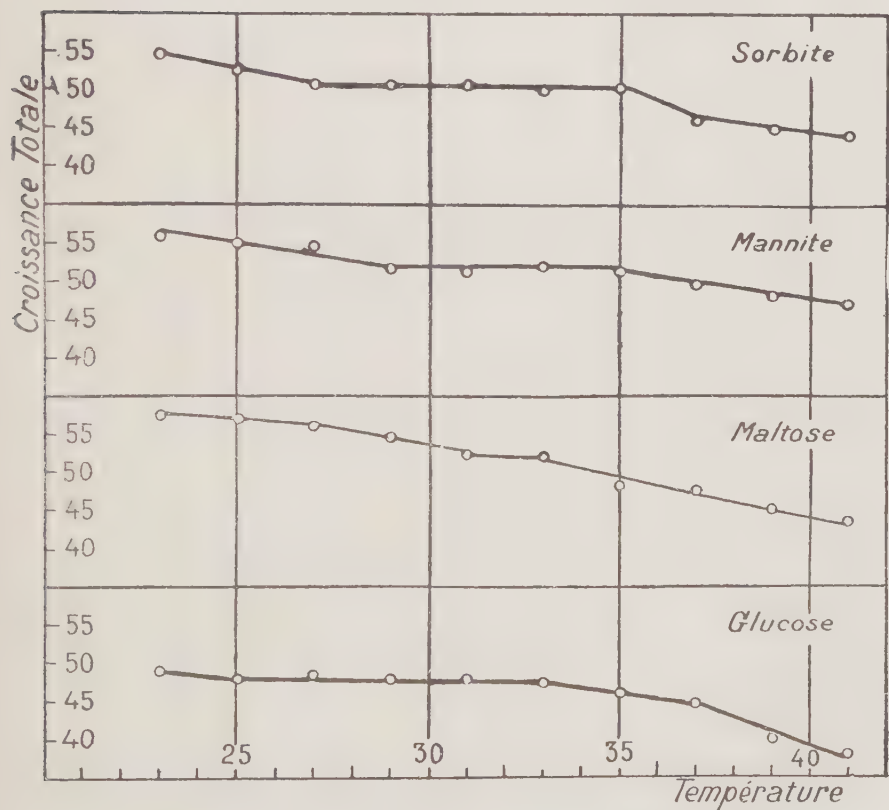


FIG. 25. — Croissance totale en fonction de la température des cultures de *B. coli* sur milieu synthétique, en présence de différentes sources carbonées. La croissance totale, c'est-à-dire le rendement, diminue quand la température s'élève.

sacrée à chaque source ternaïre. Celles-ci comprenaient un hexose, le glucose, deux hexites, sorbite et mannite et un disaccharide le maltose. Dans chaque série dix expériences furent réalisées dans une échelle de température s'étendant de 23 à 41 degrés. Le réglage de la température du thermostat était obtenu dans les conditions décrites en détail p. 23. Peut-être eût-il été intéressant d'étudier une gamme de température plus étendue, en particulier du côté des températures basses. J'ai dû cependant me limiter à l'étendue des thermomètres régulateurs dont je disposais. La figure 24 permettra de se rendre compte de l'aspect des courbes de croissance à haute et basse température (*B. coli* sur glucose, à 23 et 37°).

1° RENDEMENT DE LA CROISSANCE.

Les résultats sont résumés par le tableau suivant :

TABLEAU XXVIII.

*Rendement de la croissance des cultures de B. coli
aux dépens de différentes sources ternaïres,
en fonction de la température.*

Température	Glucose		Mannite		Sorbite		Maltose	
	Croissance totale	Rendement	Croissance totale	Rendement	Croissance totale	Rendement	Croissance totale	Rendement
23	49,0	0,26	56,8	0,30	54,7	0,29	57,0	0,30
25	48,2	0,26	55,0	0,29	53,0	0,28	56,7	0,30
27	48,5	0,26	54,5	0,29	50,7	0,27	56,0	0,30
29	48,0	0,26	51,5	0,27	50,6	0,27	54,8	0,29
31	48,0	0,26	51,2	0,27	50,7	0,27	52,5	0,28
33	47,5	0,25	51,7	0,27	50,0	0,27	52,4	0,28
35	46,0	0,25	51,3	0,27	50,5	0,27	48,0	0,26
37	44,5	0,25	49,5	0,26	46,0	0,25	47,5	0,25
39	40,0	0,21	48,0	0,26	45,0	0,24	45,0	0,24
41	38,0	0,20	47,2	0,25	44,0	0,23	43,5	0,23

La figure 25 met en évidence le fait que les variations de rendement sur les quatre sucres sont sensiblement parallèles. Entre 29 et 33 degrés il semble que le rendement soit assez stable. En dehors de ces limites il s'abaisse très sensiblement du côté des températures élevées et se relève du côté des températures basses.

2° LE TAUX DE CROISSANCE.

Les taux de croissance et les temps de division en fonction de la température, calculés d'après la pente (en coordonnées semi-logarithmiques) de la phase exponentielle de chaque culture, sont donnés par le tableau ci-dessous (taux de croissance = nombre de divisions à l'heure ; temps de division en minutes).

TABLEAU XXX.

Taux de croissance et temps de division des cultures de B. coli en présence de différents glucides, en fonction de la température.

Température	cose		Mannite		Sorbite		Maltose	
	Taux de croissance	Temps de division	Taux de croissance	Temps de division	Taux de croissance	Temps de division	Taux de croissance	Temps de division
23	0,53	113'	0,49	122'	0,41	146'	0,41	146'
25	0,60	100'	0,59	102'	0,49	122'	0,49	122'
27	0,69	87'	0,66	91'	0,58	103'	0,51	117'
29	0,81	74'	0,78	77'	0,67	89'	0,64	93'
31	0,91	66'	0,88	68'	0,79	76'	0,76	91'
33	1,10	55'	1,00	60'	0,86	70'	0,83	72'
35	1,22	49'	1,10	55'	0,94	64'	0,89	67'
37	1,33	45'	1,22	49'	1,10	55'	0,91	66'
39	1,25	48'	1,22	49'	1,10	55'	0,89	67'
41	1,23	49'	1,19	50'	0,90	66'	0,91	66'

En exprimant ces résultats par le coefficient Q_{10} , on trouve entre 23 et 33 degrés et entre 27 et 37 degrés, les chiffres suivants :

Source ternaire	Q_{10} entre 23° et 33°	Q_{10} entre 27° et 37°
Glucose.....	2,1	1,90
Mannite.....	2,0	1,85
Sorbite.....	2,1	1,90
Maltose.....	2,1	1,80

Ce coefficient ne révèle donc pas de différence bien sensible entre les différents sucres. Tout au plus peut-on noter que l'optimum paraît atteint pour le maltose dès 35 degrés, alors que pour les autres sucres il ne l'est qu'à 37°.

Si l'équation d'Arrhénius peut exprimer ces résultats d'une ma-

nière satisfaisante, on doit, en portant en abscisse l'inverse de la température absolue, en ordonnée le logarithme naturel du taux de croissance, trouver que les points expérimentaux s'alignent suivant des droites de pente $E/2$.

C'est ce qu'exprime la figure 26. Comme on le voit ce mode d'expression est dans l'ensemble satisfaisant, surtout pour les résultats

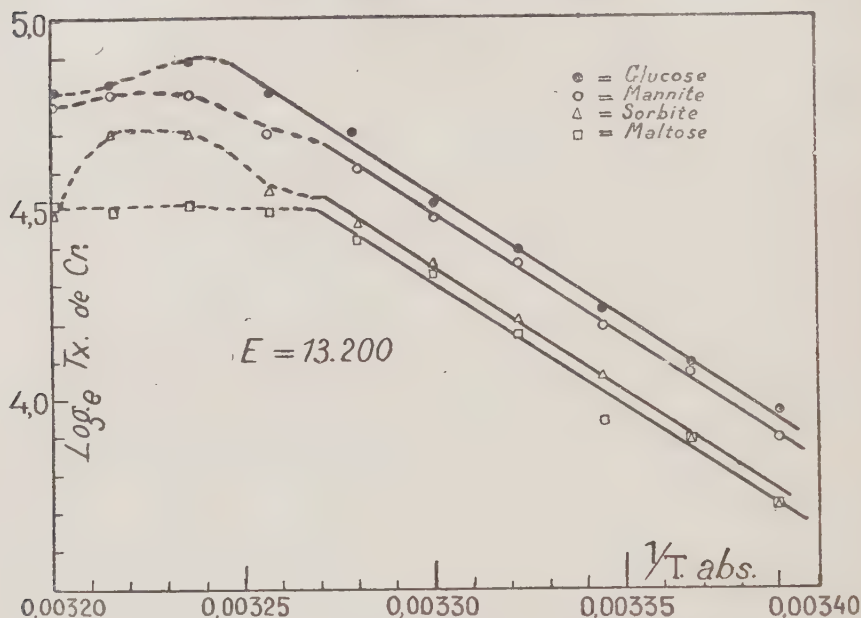


FIG. 26. — *B. coli* sur milieu synthétique, en présence de différentes sources ternaires. Logarithme naturel du taux de croissance en fonction de l'inverse de la température absolue.

qui concernent le glucose et le mannite. Il l'est moins pour la sorbite et le maltose. Cependant il est assez clair que la pente des quatre droites représentatives est sensiblement la même. Cette pente indique pour la constante E une valeur numérique de 13.200.

Discussion des résultats.

1° LE RENDEMENT EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.

Les résultats qui viennent d'être présentés sont donc en accord avec ceux que l'on pouvait tirer des données de GRAHAM SMITH *oc. cit.*). Quoique la marge de variation du rendement avec la tem-

pérature ne soit pas très étendue elle est cependant sensible, puisque dans le cas du maltose, par exemple, le rendement est de 0,30 environ à 23 degrés et de 0,23 à 41 degrés, soit une variation de 25%.

Reste à savoir comment on peut interpréter ces variations. GRAY (1928) qui a observé un effet analogue dans la croissance des embryons de *Salmo fario* en fonction de la température, donne pour très probable l'explication suivante : à haute température, l'importance relative du métabolisme de maintien est plus élevée, la ration d'entretien est plus importante. La ration de croissance en est corrélativement abaissée, d'où diminution apparente du rendement de la croissance. GRAY rappelle d'autre part les résultats de GRAHAM SMITH et pense qu'ils forment « a striking parallel » à ses observations. Il croit pouvoir en conclure que, d'une manière générale : « the processes of metazoon growth « in vivo » are similar to those of bacteria ». Cette dernière affirmation est assez vague pour ne pas trop prêter à critique. Il n'en est pas même pour l'interprétation donnée par GRAY des variations de rendement. GRAY ne paraît pas avoir tenu compte d'un autre facteur qui, dans son hypothèse, agirait en sens inverse de celui qu'il invoque : à basse température le taux de croissance diminue et, comme on l'a vu au chapitre V, une telle variation doit s'accompagner d'une *augmentation* de la ration d'entretien.

On aurait donc d'assez bonnes raisons de soutenir que, compte tenu de la ration d'entretien, le rendement global doit *diminuer* quand la température s'abaisse.

Quoi qu'il en soit, il est fort possible que l'interprétation de GRAY soit valable dans le cas des métazoaires, mais il est douteux qu'elle puisse l'être dans le cas des bactéries. Il est probable, et l'expérience paraît le confirmer, que la part des dépenses d'entretien dans la croissance des bactéries est extrêmement faible, et en tous cas trop peu importante pour que l'explication de GRAY soit plausible (V. chap. V). C'est donc bien le *rendement réel* des processus de croissance, des réactions de synthèses, qui est augmenté lorsque la température décroît. Il paraît impossible pour l'instant d'avancer une interprétation plus précise. Mais il serait certainement très utile d'étudier systématiquement cette question et d'essayer d'établir entre ces variations de rendement et la nature des substrats une corrélation qui ne peut manquer d'exister. Les résultats qui viennent d'être exposés permettent au moins de poser ce problème.

2° LE TAUX DE CROISSANCE.

Les résultats sont négatifs en ce qui concerne les variations du taux de croissance avec la température, en ce sens qu'il n'apparaît pas de différences sensibles dans les constantes (Q_{10} et « accroissement critique ») suivant la nature de la source ternaïre. À s'en tenir aux conceptions de CROZIER, la réaction maîtresse doit être la même dans tous les cas.

Peut-on, de la valeur de l'accroissement critique (13.200), tirer quelque conclusion quant à la nature de cette réaction ? Nous avons vu (chap. IV) que le taux de croissance paraît dépendre dans une large mesure de l'activité des enzymes qui attaquent les corps ternaïres ; cette conclusion s'appuie sur le parallélisme évident qui existe entre les variations du taux de croissance et de l'activité des enzymes en fonction de la concentration et de la nature des substrats. On pourrait donc s'attendre à trouver des constantes de températures analogues dans les deux catégories de phénomènes. Les rares données que l'on possède à ce sujet ne confirment pas ces prévisions. CROZIER a calculé d'après les chiffres de QUASTEL et WETHAM la valeur de E pour l'activité de la succinodéhydrogénase en fonction de la température (réduction du bleu de méthylène par des *B. coli* « non proliférants »). Il trouve le chiffre de 16.700. Cette différence considérable autorise-t-elle à penser que les conclusions du chapitre IV ne sont pas fondées, que le taux de croissance n'est pas dans une dépendance étroite vis-à-vis des activités enzymatiques ? Elle indique plutôt, semble-t-il, que l'on ne saurait accorder beaucoup de confiance à la notion d'une « réaction maîtresse » imposant son rythme et sa caractéristique à un processus aussi complexe que celui de la croissance. BURTON (1936) a montré que si l'équation d'ARRHÉNIUS peut rendre des services comme relation empirique, permettant de calculer une constante, il est en revanche impossible d'attribuer au coefficient ainsi défini le sens précis qu'il prend lorsqu'il s'agit de réactions simples. Il a montré en outre que, pour qu'une réaction puisse imposer sa vitesse à une chaîne même très courte, il faut qu'elle soit considérablement plus lente que toutes les autres réactions de la chaîne, et cela d'autant plus que la chaîne est plus longue. La vitesse des transformations le long d'une chaîne de réactions dépend à la fois de la vitesse de toutes les réac-

tions de la chaîne, et de leurs constantes d'équilibre. Il est fort possible que la température agisse en particulier par la modification des constantes d'équilibre.

En résumé, si l'on peut admettre que l'activité des actions enzymatiques joue un rôle important dans la fixation du taux de croissance, il est impossible de croire qu'elle puisse imposer sa vitesse propre à toute la chaîne des réactions de synthèses. Il n'y a pas à proprement parler de « master reaction ». Lorsque l'on passe d'un substrat ternaire à un autre, la vitesse d'un certain nombre de réactions de la chaîne, et principalement de la première, se trouve modifiée et l'on observe une modification corrélative, mais non proportionnelle, de la vitesse de l'ensemble, c'est-à-dire du taux de croissance.

Notons enfin que, tout au moins dans l'échelle de température étudiée, on n'observe pas de « point-critique » correspondant à une modification brusque des coefficients.

Résumé du chapitre VII.

1^o Le rendement de la croissance des bactéries sur différents aliments ternaires diminue dans une certaine mesure avec la température. Cette variation ne saurait être attribuée, comme le pense GRAY, à une modification de l'importance relative de la ration d'entretien et de la ration de croissance. C'est bien le rendement des synthèses lui-même qui est modifié.

2^o Le taux de croissance augmente avec la température suivant une loi qui satisfait à peu près, jusque vers 37°, la relation d'ARRHÉNIUS. Il faut se garder cependant d'en conclure que le taux de croissance est déterminé par la vitesse d'une réaction unique.



CHAPITRE VIII

L'expression analytique de la croissance des cultures bactériennes.

I

INTRODUCTION.

Nous avons, au cours des chapitres précédents, cherché à analyser séparément, à mettre successivement en évidence, les lois qui fixent la valeur des constantes physiologiques de croissance en fonction des variations de certains facteurs du milieu : nature et concentration des aliments. Nous nous sommes demandés si ces constantes, le rendement et le taux, sont indépendantes l'une de l'autre, ou si au contraire l'une n'est pas fonction de l'autre : si le rendement ne dépend pas dans une certaine mesure du taux de croissance. Les résultats essentiels de cette étude ont été les suivants :

1° Le rendement de la croissance est indépendant de la dilution des aliments.

2° Le taux de croissance est fonction de la dilution des aliments. Cette fonction s'exprime par une courbe d'allure hyperbolique.

3° Le rendement ne varie pas sensiblement lorsque le taux de croissance varie.

4° Il ne varie pas non plus sensiblement au cours de la croissance.

Enfin l'expérience indique que, dans certaines conditions tout au moins, la croissance est uniquement gouvernée par l'épuisement du milieu en un ou plusieurs aliments, à l'exclusion de tout autre facteur limitant.

Il convient maintenant de considérer les courbes de croissance dans leur ensemble, et non plus comme nous l'avons fait jusqu'ici par tronçons, et de se demander si les règles que l'on vient d'énoncer

se retrouvent dans la loi de croissance générale. Tel est l'objet de ce chapitre. Le problème que nous nous posons revient donc à chercher une expression analytique de la croissance et à vérifier qu'elle s'adapte de façon satisfaisante aux résultats expérimentaux. Ce faisant nous poursuivons trois buts :

1^o S'assurer que les résultats acquis par l'étude de certaines phases de la croissance se vérifient encore lorsque l'on considère le phénomène dans son ensemble.

2^o S'assurer que des facteurs dont on pourrait ne pas avoir tenu compte n'interviennent effectivement pas dans la croissance.

3^o Nous mettre en possession d'une expression analytique correcte, maniable, dont les coefficients aient un sens physiologique précis. Une telle expression pourrait rendre de grands services dans l'étude de la croissance ou plus exactement pour l'utilisation des courbes de croissance comme moyen d'analyse physiologique.

Nous devons toutefois nous garder d'une illusion, grossière sans doute, mais trop commune pour qu'il soit possible de la passer tout simplement sous silence : le fait qu'une expression mathématique s'adapte fidèlement aux résultats expérimentaux, qu'elle permette éventuellement de les prévoir avec précision, ne suffit en *aucune façon* pour démontrer que les hypothèses servant de base à cette expression soient exactes. Chacun sait que des expressions analytiques profondément dissemblables peuvent s'adapter également bien aux mêmes résultats expérimentaux. Mais aussi, et cette notion est moins courante, des hypothèses complètement différentes peuvent fort bien conduire à des expressions analytiques *identiques*. C'est ce que TEISSIER (1928) a mis en évidence d'une façon particulièrement saisissante en comparant les diverses théories de la croissance : le contenu d'une expression mathématique est toujours beaucoup plus riche que ne le croit, en général, son auteur. Le fait qu'exprimée mathématiquement une hypothèse conduit à des prévisions quantitatives exactes en est une vérification supplémentaire indispensable, mais en aucun cas il n'en est une démonstration suffisante. Celle-ci ne peut résulter que d'une étude expérimentale directe. Quiconque a une certaine expérience de la littérature relative aux théories de la croissance comprendra pourquoi il est nécessaire d'insister sur ce point.

On sait, en effet, que le problème qui nous préoccupe a déjà tenté

de nombreux auteurs, et qu'une foule de théories, dont les points de départ, sinon l'aboutissement, sont fort différents, ont été proposées pour rendre compte de la croissance des populations comme de celles des organismes. Il ne saurait être question d'en faire ici l'historique et la critique. Celle-ci a été d'ailleurs présentée par TEISSIER (1928, 1933, 1936) dans diverses publications dont on s'inspirera ici pour rappeler seulement les conceptions les plus répandues, ou celles qui ont particulièrement trait à notre objet : la croissance des micro-organismes.

II

LES PRINCIPALES CONCEPTIONS THÉORIQUES DE LA CROISSANCE

Il est toujours possible d'exprimer la loi de croissance d'une population ou d'un organisme sous la forme différentielle simple :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

qui exprime que la vitesse dx/dt de la croissance est proportionnelle à la masse de la substance vivante, x , et à un autre facteur, μ qui est le taux de croissance. Cette équation a la valeur d'une définition. Si μ ne variait pas au cours de la croissance, la loi serait une exponentielle. L'exponentielle est si l'on veut la première approximation de la loi de croissance. C'est en effet la première qui ait été entrevue, par MALTHUS, sous la forme intégrée de l'équation (1) :

$$x = e^{\mu}$$

et on sait quelles craintes a suscité cette redoutable loi ! Mais toute croissance est limitée, μ varie donc, et doit être lui-même une fonction de x . Toute théorie de la croissance n'est autre chose qu'une hypothèse sur la nature de cette fonction :

$$\mu = f(x) \quad (2)$$

On peut, avec TEISSIER (1928), classer les théories de la croissance, non d'après leur forme mathématique, souvent identique, et pouvant en tous cas toujours se ramener à l'équation (1), mais d'après leur point de départ logique. On distinguera ainsi : a) les théories formelles ; b) les théories mécanistes ; c) les théories physio-

logiques. Les premières, œuvres de mathématiciens, n'ont pas la prétention d'exprimer des hypothèses précises sur la nature des phénomènes qui limitent la croissance, mais d'en donner une expression générale logique. Les secondes assimilent la croissance des êtres vivants à quelque processus physique simple. Les dernières cherchent à combiner sous la forme d'une expression analytique les lois physiologiques qui gouvernent la croissance.

1^o THÉORIES FORMELLES : LOI DE VERHULST-PEARL.

Se laissant guider par des considérations de pure logique et de commodité de calcul, le mathématicien VERHULST proposa en 1845 une loi de croissance s'exprimant par la relation :

$$\frac{dx}{dt} = bx \frac{K-x}{K} \quad (3)$$

On voit que l'hypothèse faite sur la relation $\mu = f(x)$ est la plus simple possible. Le taux de croissance serait une fonction linéaire décroissante de la quantité de matière vivante. VERHULST montra que cette équation, intégrée, se représente par une courbe en S à asymptote horizontale et à point d'inflexion situé à mi-hauteur. L'application de cette loi aux populations humaines permit à VERHULST d'obtenir un remarquable résultat : il calcula les populations limites que pourraient atteindre la France et la Belgique, prévisions qui se trouvent vérifiées avec une étonnante précision. Ignorés pendant près d'un siècle, les travaux de VERHULST furent mis en vedette par PEARL, qui appliqua cette loi de croissance dans de nombreux cas : croissance des populations humaines, des populations de Drosophiles, des cultures de levure d'après les chiffres de CARLSON. Beaucoup d'autres auteurs en ont, depuis, fait usage, en particulier pour la croissance des cultures de micro-organismes (GAUSE et ALPATOV 1931, GREAVES et HICKMAN 1934, RICHARDS 1928, DEBIESSE, 1939). Nous allons voir de plus que d'autres auteurs partis d'hypothèses différentes sont arrivés à la même expression mathématique.

2^o THÉORIES CHIMIQUES.

La célèbre théorie de ROBERTSON (1921 et suiv.) qu'il faut maintenant citer a été principalement appliquée par son auteur à la

croissance des métazoaires. Mais ROBERTSON lui-même, et d'autres, inspirés par ses travaux, en ont étendu le domaine d'application aux populations de micro-organismes. L'idée essentielle de ROBERTSON (inspirée du reste par certains travaux de LOEB) est que les processus de croissance sont en tous points comparables à un phénomène d'autocatalyse, ou plus exactement qu'ils sont sous la dépendance d'une réaction autocatalytique qui les gouverne entièrement. Et c'est pourquoi la croissance s'exprime par une formule qui est aussi celle des réactions « monomoléculaires autocatalytiques » :

$$\frac{dx}{dt} = Kx(a - x).$$

Cette équation, on le voit, est identique à la logistique de VERHULST. Mais le raisonnement par lequel ROBERTSON a été amené à employer cette formule, l'interprétation mécaniste des phénomènes de croissance qu'il croit pouvoir en tirer, n'ont aucun point commun avec les arguments de simple logique qui ont conduit VERHULST au même résultat. L'extrême fragilité des conceptions de ROBERTSON qui, d'une simple analogie formelle entre la marche de certaines réactions chimiques et l'évolution de la croissance, croit pouvoir conclure à une identité des mécanismes sous-jacents et ne craint pas pour cela d'assimiler la croissance d'un métazoaire à une « réaction monomoléculaire autocatalytique », a été souvent soulignée et il est inutile de revenir sur les nombreuses discussions que ces conceptions ont eu au moins le mérite de soulever. Mais si la tendance à un « mécanicisme outrancier et naïf » (TEISSIER, 1936) dont témoignent ces interprétations est particulièrement apparente dans leur application à la croissance des métazoaires, elle l'est moins, et a soulevé moins d'objections, lorsqu'il ne s'agit plus que de la croissance des cultures de microorganismes. Dans ce domaine, les idées de ROBERTSON l'ont conduit à la conception de « l'allélocatalyse » dont il a été question à propos de la phase de latence (p. 11). Contentons-nous de rappeler à ce sujet que les expériences sur lesquelles ROBERTSON se basait n'ont pu être répétées par d'autres auteurs. La théorie de l'allélocatalyse n'a donc ni support expérimental, ni même de raison d'être bien sérieuse, puisqu'elle est applicable à une phase de la croissance dont l'existence même apparaît comme tout à fait contingente (chap. I, p. 15). La conception « catalytique » de la croissance conduit à des explications purement

verbales, dénuées de tout sens physiologique intelligible. On peut sans crainte d'erreur la considérer comme aussi périmée dans son application aux populations de microorganismes, qu'aux êtres vivants plus complexes. Ce qui n'empêche pas que l'équation de ROBERTSON ne puisse assez souvent conduire à des ajustements satisfaisants, tout comme la logistique de VERHULST, et pour les mêmes raisons, qui n'ont absolument rien à voir avec l'auto-catalyse ou l'allélocatalyse.

3^o THÉORIES PHYSIOLOGIQUES.

On doit ici citer ensemble les travaux déjà anciens de DESCHAMPS (1903) et de MAC KENDRICK et PAI (1911). Le premier, comme les seconds, paraît ne s'être connu aucun prédécesseur. Partis des mêmes hypothèses ils parviennent au même résultat. Ils semblent avoir été les premiers à tenter de résumer en une expression analytique des hypothèses physiologiques précises, sinon exactes. Ces hypothèses concernent le cas où la croissance d'une population de microorganismes n'est limitée que par l'appauvrissement du milieu en aliments. Les auteurs supposent que le taux de croissance est linéairement proportionnel à la concentration des substances alimentaires :

$$\mu = KC$$

ils admettent d'autre part que les substances alimentaires disparaissent proportionnellement à l'accroissement de la culture, ce qui revient, on le voit, à supposer que le taux de croissance est une fonction linéaire décroissante de la masse de substance vivante formée, hypothèse semblable à celle de VERHULST et qui conduit au même résultat. On a évidemment :

$$\frac{dx}{dt} = Kx(a - x)$$

DESCHAMPS a montré en outre que l'on parvenait, moyennant certaines hypothèses, à une expression analogue lorsque la croissance est limitée, non par l'épuisement des aliments, mais par l'accumulation des déchets toxiques. DESCHAMPS n'a pas apporté de vérifications expérimentales proprement dites de son équation ; MAC KENDRICK et PAI ont montré qu'on pouvait y ajuster la croissance de quelques cultures de *B. coli*. Mais ils n'ont pas cherché à

démontrer expérimentalement la validité de leurs hypothèses, et dans les courbes ajustées par eux il ne semble pas que l'épuisement des aliments soit le seul facteur limitant, ni même le facteur principal.

Ces tentatives déjà anciennes ne constituent donc pas un progrès bien marqué sur les résultats de l'analyse simplement formelle de VERHULST. Mais une orientation nouvelle s'est manifestée ces dernières années, en particulier dans les travaux de GRAY (1928), EPHRUSSI et TEISSIER (1932), CHOUARD et TEISSIER (1932), TEISSIER (1936). Toutes ces recherches ont pris pour base des hypothèses physiologiques concrètes, directement vérifiées, ou au moins vérifiables par l'expérience, et elles ont abouti à des schémas particulièrement satisfaisants des diverses croissances en cause, à des équations dont tous les paramètres ont un sens biologique immédiatement intelligible.

On doit en particulier à TEISSIER une expression réellement nouvelle, cette fois, de la croissance des populations. Les hypothèses formulées par TEISSIER, étayées sur les vérifications expérimentales de MONOD (1935, 1937), MONOD et TEISSIER (1936) ainsi que sur certains résultats des travaux précédemment cités, concernent le cas où la croissance n'est limitée que par l'appauvrissement du milieu. Ce sont les suivantes :

1° Le rendement matériel des processus de croissance est constant, ce que l'on peut exprimer par la relation :

$$\frac{dx}{dt} = -K \frac{dC}{dt}$$

C étant la concentration d'aliment présente dans le milieu au temps t .

2° Le taux de croissance tend vers une limite lorsque la concentration de l'aliment est grande, et la variation du taux de croissance par rapport à la concentration de l'aliment est d'autant plus rapide qu'est plus grand l'écart entre le taux actuel et le taux maximum, ce qui peut s'exprimer par :

$$\frac{d\mu}{dC} = B(1 - \mu)$$

Cette hypothèse conduit à représenter la relation entre le taux de croissance et la concentration de l'aliment par l'arc asymptotique

d'une courbe exponentielle. En combinant cette dernière expression avec celle qui exprime que le rendement matériel des processus de croissance est constant, on arrive à une expression différentielle de la forme :

$$\frac{dx}{dt} = \mu_0 x [1 - e^{-\lambda(1-x)}] \quad (4)$$

III

L'EXPRESSION ANALYTIQUE DE LA CROISSANCE DES POPULATIONS BACTÉRIENNES

Il est hors de doute que l'équation de TEISSIER représente la solution la plus rationnelle qui ait été donnée jusqu'ici de la croissance des populations, tout au moins lorsque celle-ci est limitée par l'épuisement des aliments. Nous verrons tout à l'heure du reste que cette expression possède une valeur plus générale encore et peut probablement s'appliquer à des cas où la croissance dépend d'autres facteurs limitants.

Comme on le voit les hypothèses qui servent de base à cette expression correspondent exactement aux conclusions auxquelles on est amené par l'étude expérimentale directe des variations du taux et du rendement de la croissance dans les cultures bactériennes. Nous avons admis cependant (chap. IV, p. 77) que la relation taux de croissance-concentration des aliments pouvait être représentée par une courbe hyperbolique, alors que les hypothèses de TEISSIER l'ont conduit à exprimer cette relation par l'arc asymptotique d'une exponentielle. En fait, il n'existe pas de raisons théoriques qui permette avec quelque certitude de faire un choix entre ces deux représentations. Et les résultats directs de l'expérience ne sont pas assez précis encore pour imposer ce choix : ils pourraient sans doute s'accommoder tout aussi bien de l'une ou l'autre, la forme des courbes représentatives n'étant pas sensiblement différente. Il est vrai que le raisonnement qui conduit à accepter une relation exponentielle, est d'une portée plus générale, mais l'équation (4) à laquelle on est ainsi amené présente l'inconvénient d'être d'un manie-ment peu commode, et de se prêter difficilement aux calculs numé-

riques. Le remplacement de la relation exponentielle par une relation hyperbolique permet en revanche (MONOD et MORIN, 1942) d'aboutir à une équation différentielle facilement intégrable. Cette expression, si elle diffère quelque peu par sa forme de celle de TEISSIER, n'en diffère pas par ses bases théoriques, et les courbes de croissance qu'elle permet de construire sont d'allure identique. Avant d'en exposer les vérifications expérimentales, il convient d'en rappeler les justifications.

On admet que toute croissance peut être représentée par une relation de la forme

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

Il reste à définir la relation $\mu = f(x)$. Nous écrirons tout d'abord que le rendement de la croissance est constant, ce qui s'exprime, comme nous l'avons vu plus haut, par :

$$\frac{dC}{dt} + K \frac{dx}{dt} = 0 \quad (5)$$

Enfin nous admettons que le taux de croissance est une fonction de la concentration des aliments de la forme :

$$\mu = \mu_o \frac{C}{C_1 + C} \quad (6)$$

Les conditions initiales étant qu'au temps $t = 0$, on ait $x = x_o$ et $C = C_o$, l'équation (2) s'intègre en donnant :

$$C = C_o + Kx_o - Kx \quad (7)$$

D'autre part, en combinant (1) et (6) on obtient :

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \mu_o \frac{C}{C_1 + C} \quad (8)$$

et en combinant (7) et (8)

$$\frac{(C_1 + C_o + Kx_o - Kx) dx}{x(C_o + Kx_o - Kx)} = \mu_o dt$$

Equation qui s'intègre facilement en donnant :

$$\mu_o t = \frac{C_1 + C_o + Kx_o}{C_o + Kx_o} \text{Log} \frac{x}{x_o} - \frac{C_1}{C_o + Kx_o} \text{Log} \frac{C_o + Kx_o - Kx}{C_o} \quad (9)$$

Pour simplifier cette expression, posons :

$$P = \frac{C_1}{C_o + Kx_o}$$

et :

$$Q = \frac{C_o + Kx_o}{Kx_o}$$

Il vient :

$$\mu^o t = (1 + P) \text{Log} \frac{x}{x_o} - P \text{Log} \left(Q - \frac{x}{x_o} \right) + P \text{Log} (Q-1) \quad (10)$$

P et Q sont deux coefficients qui n'interviendront que pour la commodité des calculs (1). Les constantes de base qui figurent dans l'équation (9) ont un sens biologique parfaitement clair, qu'il sera bon de rappeler ici. C_o et x_o sont des paramètres donnés par les conditions de l'expérience : le premier représente la concentration initiale de l'aliment limitant, le second, le nombre de bactériesensemencées. Le coefficient K correspond au rendement de la croissance sur l'aliment limitant. Il est évident qu'il est égal à l'inverse du rendement tel que nous l'avons défini au chapitre III :

$$\frac{1}{K} = \frac{\text{quantité de substance vivante formée}}{\text{quantité d'aliment utilisé}}$$

La constante μ_o exprime le *taux de croissance maximum*. (Si on employait les logarithmes à base 2, ce serait le nombre de divisions par unité de temps. Avec les logarithmes népériens, ce nombre doit être multiplié par un coefficient constant). Enfin la constante C_1 représente la concentration d'aliment limitant pour laquelle le taux de croissance est inférieur de moitié au taux maximum.

Les propriétés de l'équation (10) sont brièvement les suivantes : elle est représentée par une courbe en S à asymptote horizontale, dont la valeur est donnée par :

$$\frac{X_a}{X_o} = Q$$

X_a étant la valeur de l'asymptote. Les propriétés du point d'inflexion sont particulièrement intéressantes à considérer, car elles mettent bien en évidence les différences qui distinguent cette loi de

(1) Le coefficient Q exprime la densité maximum atteinte par la culture.

croissance d'une logistique. La position du point d'inflexion est donnée par :

$$\frac{X_i}{X_a} = 1 + P - \sqrt{P(1 + P)} \quad (11)$$

la valeur du rapport $\frac{X_i}{X_a}$ se rapproche de 1 quand P tend vers 0, et tend asymptotiquement vers $1/2$ quand P croît indéfiniment. La

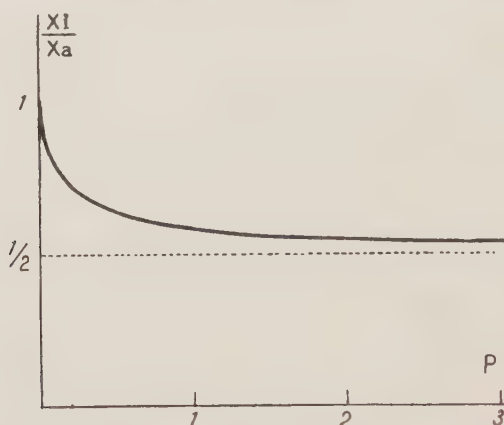


FIG. 27. — Variations de la valeur du rapport X_i/X_a (position du point d'inflexion dans la courbe figurative de l'équation (10)) en fonction de la valeur de P .

courbe figurative de la fonction (11) est donnée par la figure 27. Comme la valeur de P est donnée par le rapport :

$$P = \frac{C_1}{C_0 + Kx_0}$$

et que Kx_0 est en pratique toujours petit par rapport à C_0 , la valeur de P dépend en fait du rapport de la concentration initiale à la concentration C_1 . D'autre part les concentrations initiales utilisées sont toujours grandes par rapport à la concentration pour laquelle le taux de croissance est réduit de moitié (V. chap. IV, p. 77). Il résulte de ceci que la courbe de croissance doit presque toujours être nettement dissymétrique, alors que l'équation de la logistique impose une courbe symétrique. La courbe de l'équation (10) se rapprocherait d'une logistique dans le cas où la croissance aurait lieu dans un milieu extrêmement dilué.

Ces propriétés, et en particulier le rôle de la constante C_1 , sont

illustrées par la figure 28 qui représente la courbe de la fonction (10) pour trois valeurs de C_1 , les autres constantes conservant les mêmes valeurs.

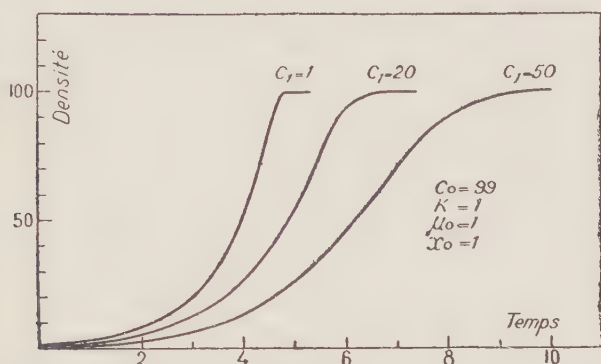


FIG. 28. — Courbes de l'équation (10) pour trois valeurs de la constante C_1 .

VÉRIFICATIONS EXPÉRIMENTALES.

J'ai eu de très nombreuses occasions de vérifier que ces diverses propriétés permettaient à l'équation (10) de reproduire avec une remarquable fidélité les courbes de croissance expérimentales. Les séries d'ajustements que l'on trouvera ci-après en font foi. Plutôt que de donner des ajustements variés se rapportant à des espèces bactériennes et à des milieux distincts, il a paru plus intéressant et beaucoup plus démonstratif de figurer côte à côte les résultats se rapportant à une série d'expériences homogènes, dans lesquelles un seul paramètre variait : la concentration initiale de l'aliment limitant. Les figures 29 et 30 se rapportent à la croissance de *B. coli* sur milieu *S* additionné de glucose en quantité variable. La figure 31 exprime la croissance de la même bactérie en milieu *S* additionné de lactose. Les expériences ont été faites dans les conditions habituelles. Les valeurs des constantes n'ont pas été choisies pour chaque courbe de manière à donner le meilleur ajustement possible, mais au contraire fixées une fois pour toutes pour chacune des deux séries. Les valeurs admises sont celles que l'on peut tirer des expériences des chapitres III et IV. Elles sont données par le tableau ci-dessous.

	Milieu <i>S</i> + glucose	Milieu <i>S</i> + lactose
C_1	4	20
K	3,39	3,30
μ_0	1,85	1,1

Dans chaque série les courbes théoriques ne diffèrent entre elles que par la valeur du paramètre C_0 , correspondant à la concentration initiale de l'aliment ternaire (1). L'inspection des graphiques révèle

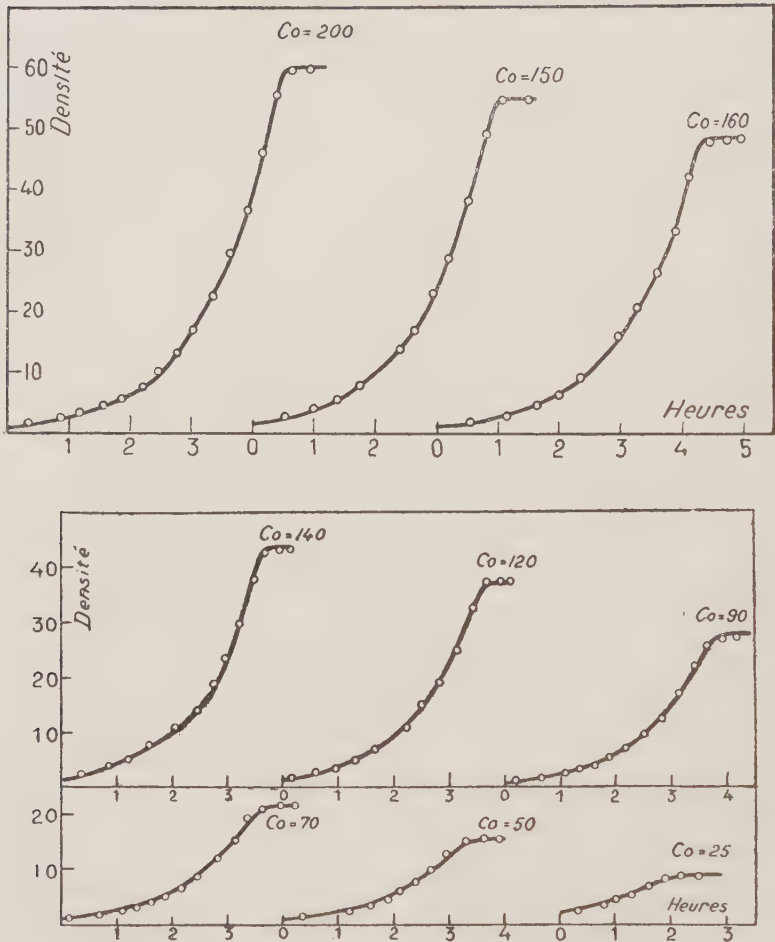


FIG. 29 et 30. — Croissance des cultures de *B. coli* en milieu synthétique en présence de différentes concentrations initiales de glucose. Concentrations (C_0) exprimées en milligramme par litre. La courbe d'interpolation exprime l'équation (10).

lera avec quelle précision les variations de ce seul paramètre permettent de rendre compte, dans chaque cas, des résultats expé-

(1) On doit tenir compte également de variations, faibles d'ailleurs, du paramètre x_0 , proportionnel à la densité de l'inoculation.

mentaux. On remarquera également les différences très sensibles entre les courbes des croissances sur glucose et sur lactose ; elles sont manifestes dans la partie terminale de la courbe de croissance,

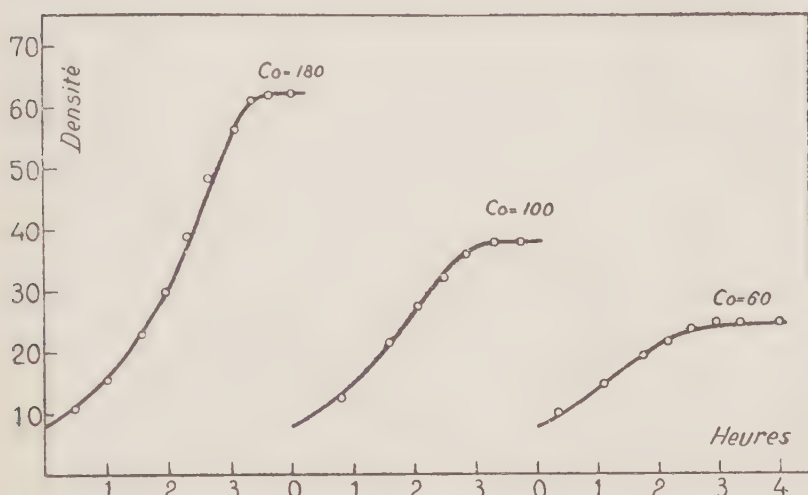


FIG. 31. — Croissance des cultures de *B. coli* en milieu synthétique en présence de différentes concentrations initiales de lactose. Concentrations (C_0) exprimées en milligramme par litre. La courbe d'interpolation est celle de l'équation (10).

beaucoup plus arrondie, et se terminant de façon beaucoup moins brutale dans le cas du lactose que dans celui du glucose. Ces différences tiennent à la constante C_1 dont la valeur est beaucoup plus élevée dans le premier cas que dans le second.

Discussion.

Ainsi, ayant exprimé mathématiquement non pas des hypothèses, mais des résultats expérimentaux directs, il convient de le souligner, ayant combiné ces résultats en une expression analytique de la croissance, expression dont tous les coefficients correspondent à des constantes physiologiques clairement définissables et mesurables, nous constatons que la loi théorique à laquelle nous sommes ainsi parvenus reproduit avec une entière fidélité les croissances expérimentalement déterminées. Nous constatons, et cela est particulièrement démonstratif, que lorsque dans une série d'expé-

riences, une seule condition varie (1), les variations du paramètre correspondant permettent de prévoir avec certitude les résultats. Presque toujours, dans des recherches de cet ordre, il s'avère nécessaire de choisir, pour chaque cas individuel, les valeurs des constantes qui s'y adaptent le mieux. Ici, il est possible de prendre pour les constantes des valeurs déterminées au préalable, et dans d'autres séries d'expériences. Ce résultat, rarement atteint par une théorie de la croissance, tient évidemment à ce qu'il a été possible d'éliminer complètement l'influence des facteurs étrangers à ceux qu'invoque la théorie.

Il est donc permis de penser que l'expression (10) représente d'une manière suffisamment complète les conditions auxquelles est soumise la croissance d'une culture bactérienne lorsque celle-ci ne dépend pas d'autres facteurs limitants que l'appauvrissement du milieu en aliments. L'étude de la courbe de croissance dans son ensemble confirme par conséquent l'ensemble des résultats précédemment obtenus par des expériences directes sur certaines phases de la croissance.

Il apparaît en particulier que les trois constantes, K , μ_0 et C_1 qui figurent dans l'équation (10) suffisent à définir entièrement les propriétés physiologiques dont dépend la croissance. Si l'importance du rendement (K) et du taux maximum de croissance (μ_0) comme constantes physiologiques est évidente, il n'en est pas de même peut-être pour la constante C_1 . Son évaluation cependant pourra présenter un grand intérêt, puisque, ainsi qu'on l'a souligné (p. 129) cette constante paraît varier beaucoup plus que les deux autres suivant la nature des aliments. Son effet sur la forme générale de la courbe de croissance, mis en évidence par la figure 28, permettra cette évaluation, extrêmement laborieuse par les méthodes directes (V. chap. IV). On verra dans la deuxième partie de ce travail que ces considérations permettent dans certains cas de classer les sucres

(1) Cependant il est souvent nécessaire de tenir compte d'un facteur qu'il n'est pas toujours possible d'éliminer complètement : il s'agit de la phase de latence. Ce phénomène pourra se manifester sous forme d'un léger retard au début de la croissance. Dans ce cas on doit, pour faire coïncider la courbe expérimentale et la courbe théorique, choisir arbitrairement l'origine des temps. Dans la plupart des expériences présentées ici le temps de latence était extrêmement faible, ou même nul. Le « retard » de la courbe expérimentale par rapport à la courbe théorique était au maximum de 1/2 heure.

en deux catégories qui correspondent précisément à un autre classement, obtenu sur des bases toutes différentes, et tenant certainement à des propriétés physiologiques essentielles.

L'examen des propriétés de l'équation (10) nous a montré que la courbe représentative ne se rapproche d'une logistique que dans le cas où la concentration initiale de l'aliment limitant est d'un ordre de grandeur au moins égal ou inférieur à la concentration C_1 . Celle-ci étant toujours faible, et même très faible, par rapport aux concentrations initiales des milieux utilisés, il est clair que toute courbe de croissance ou seule la concentration de l'aliment jouera le rôle limitant sera *très fortement dissymétrique*. Il convient de souligner que l'équation de la logistique, jusqu'ici considérée comme la plus générale, ne pourrait, du seul fait qu'elle est représentée par une courbe symétrique, s'adapter qu'à des cas limites, jamais réalisés en fait lorsque la croissance n'est fonction que de l'appauvrissement du milieu.

* * *

En revanche, il ne faudrait pas croire que toute courbe dissymétrique révèle nécessairement une croissance limitée par l'aliment. Si l'on y réfléchit quelque peu, on s'apercevra que l'équation de TEISSIER (1) est d'une valeur très générale, et que ses qualités formelles dépassent de beaucoup le cadre des hypothèses précises qui ont permis de la formuler. Si l'on considère l'exponentielle de MALTHUS comme une première approximation de l'équation générale de croissance, la logistique de VERHULST comme la seconde, on doit considérer l'équation de TEISSIER comme la troisième. Quel est en effet, le sens général de ces trois expressions ? Considérons tout d'abord l'équation générale de croissance :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Si l'on admet, en première approximation, que μ n'est pas fonction de x , que le taux de croissance ne dépend pas de la quantité de substance vivante, on obtient par intégration l'exponentielle de MALTHUS, qui représente en effet, assez fidèlement la première phase des courbes de croissance. Mais, en s'accroissant, la substance

(1) On peut considérer l'équation (10) comme une forme particulière de l'équation de TEISSIER.

vivante crée des conditions qui limitent son taux d'accroissement ; μ est une fonction décroissante de x . L'hypothèse la plus simple qui puisse être faite au sujet de cette fonction, c'est que μ est une fonction linéaire décroissante de x . Nous avons vu que cette hypothèse conduit à la loi logistique.

Mais on sait, l'expérience dans tous les domaines de la biologie l'enseigne, que jamais l'action des facteurs externes sur les processus vitaux ne se manifeste sous la forme d'une loi linéaire. Presque toujours il s'agit d'une loi plus complexe, pouvant en général s'exprimer par une fonction logarithmique, ou hyperbolique. Il est vraisemblable que, quelle que soit la nature des modifications apportées par la croissance au milieu qui la supporte, ces modifications ne commencent à réagir sensiblement sur le taux de croissance qu'au delà de certaines limites, au-dessous desquelles le taux de croissance en est indépendant, au delà desquelles au contraire leur action s'accroît très vite. C'est précisément cette hypothèse générale qui a été formulée par TEISSIER. Si l'on exprime le taux de croissance en fonction de l'accroissement de la quantité de matière vivante, cette

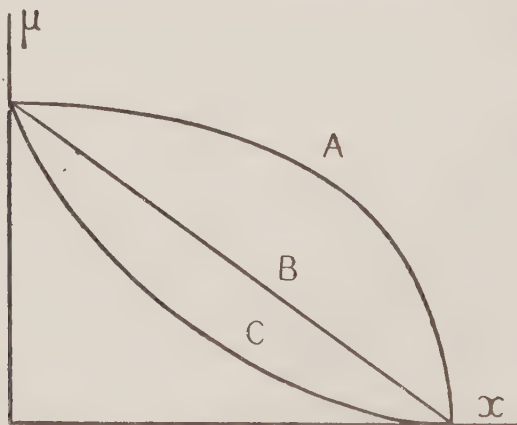


FIG. 32. — Les trois hypothèses possibles concernant la forme de la relation $\mu = f(x)$. A) hypothèse de Teissier ; B) hypothèse de Verhulst ; C) hypothèse invraisemblable.

hypothèse s'exprime par une courbe à concavité tournée vers le bas (fig. 32, courbe A), alors que l'hypothèse de VERHULST s'exprime par une droite (B). Enfin, une troisième hypothèse peut paraître possible, celle d'une courbe à concavité tournée vers le haut (fig. 32, C).

Il est facile de montrer que cette troisième hypothèse représente

en fait un cas invraisemblable : elle signifierait que l'effet retardateur des modifications apportées par la croissance *s'atténue* à mesure que ces modifications deviennent plus profondes, ce qui est tout à fait improbable, pour ne pas dire impossible. L'hypothèse de TEISSIER, celle d'une courbe à concavité *ournée vers le bas* englobe donc presque tous, sinon tous les cas possibles, quel que soit le facteur limitant, à la seule condition que ce facteur limitant soit uniquement fonction de l'accroissement de densité de la population. Or, on peut démontrer (MONOD et MORIN, 1942) que, quelle que soit la forme mathématique précise donnée à cette hypothèse (la seule condition étant que la dérivée seconde de la relation $\mu = f(x)$ soit toujours négative), elle correspond toujours à une courbe de croissance dissymétrique, à point d'inflexion situé plus haut que la moitié de l'asymptote. Cette remarque est importante, car il est permis d'en conclure que *toute croissance limitée uniquement par les conditions qu'elle crée*, s'exprime nécessairement par une courbe dissymétrique, à point d'inflexion situé plus haut que la moitié. Par conséquent, lorsqu'une courbe de croissance présentera un point d'inflexion situé *au-dessous* de la moitié on pourra en déduire qu'il intervient dans cette croissance un facteur limitant *qui n'est pas lui-même fonction*, ou du moins *pas uniquement fonction de l'accroissement de la population*, ce qui revient à dire, en somme, que les conditions de l'expérience auront varié au cours de la croissance (1). On voit donc que ces considérations quelque peu abstraites aboutissent à un résultat pratique non négligeable. Elles démontrent surtout que l'équation de TEISSIER doit être considérée comme représentant la loi générale de croissance des populations de microorganismes, sinon des populations en général.

(1) Ce raisonnement n'est évidemment applicable qu'à une population *homogène*, dont tous les individus sont également susceptibles de s'accroître et de se diviser, ce qui est en effet le cas d'une culture bactérienne en milieu liquide, à condition cependant que le milieu soit constamment brassé et homogénéisé. Dans une culture de tissus, ou dans une colonie bactérienne sur milieu solidifié, certains individus seulement ou du moins certaines cellules sont dans des conditions qui permettent la croissance. La loi de croissance se complique alors d'une relation supplémentaire qui peut en modifier complètement la forme. Il pourra alors se faire que le point d'inflexion se trouve plus bas que la moitié de l'asymptote (voir les courbes publiées par ENRUSSI et TEISSIER, 1932).

Résumé du chapitre VIII.

L'examen des principales théories de la croissance révèle qu'elles procèdent toutes de, ou se ramènent à, la loi Logistique de VERHULST. Celle-ci exprime des hypothèses trop simples pour pouvoir représenter correctement la croissance des cultures bactériennes. L'équation proposée par TEISSIER exprime au contraire des hypothèses qui cadrent exactement avec les résultats expérimentaux consignés dans les chapitres précédents. Après avoir introduit dans cette équation une modification qui n'en altère pas le caractère essentiel, on montre qu'elle permet de reproduire avec une remarquable fidélité les courbes expérimentales. L'équation de TEISSIER peut donc être considérée comme représentant fidèlement la croissance des cultures bactériennes lorsque celle-ci n'est limitée que par l'appauvrissement du milieu en aliments.

Mais les hypothèses exprimées par cette équation peuvent être prises dans une acception plus large, et il apparaît alors que la relation en question a la valeur d'une loi générale.



RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE

Après avoir montré que, dans certaines conditions tout au moins, la croissance est uniquement limitée par l'appauvrissement du milieu en un ou plusieurs aliments, divers types d'expériences nous ont permis de conclure que le rendement est indépendant de la dilution des aliments en général et de la concentration de la source ternaire en particulier. Il ne varie pas non plus au cours de la croissance. Aussi trouve-t-on entre la concentration initiale de l'aliment qui joue le rôle limitant et la croissance totale des cultures, une relation linéaire qui permet une mesure particulièrement précise et commode du rendement. Cette relation a pu être utilisée pour la détermination du rendement sur différents hydrates de carbone. Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, les résultats sont remarquablement constants, à quelques exceptions près ; et il semble qu'en général, dès lors que la molécule est attaquable, elle est intégralement utilisable.

Dans tous les cas étudiés, le rôle des toxines ou des déchets du métabolisme comme facteurs limitants était nul. D'une manière générale leur importance comme facteur d'arrêt de la croissance est certainement moins grand qu'on ne le croit le plus souvent.

Si le rendement est indépendant de la dilution des aliments, le taux de croissance au contraire en dépend. Mais cette relation, loin d'être linéaire comme l'impliquent la plupart des théories de la croissance, est d'allure hyperbolique. Le taux de croissance tend *très rapidement* vers une limite qui est atteinte dans certains cas avec des concentrations très minimes d'aliment. La valeur de ce taux de croissance limite n'est pas constante, mais au contraire caractéristique de l'aliment considéré : elle varie dans des proportions considérables suivant la nature de la source ternaire. Ces résultats indiquent que le taux de croissance doit dans une large

mesure dépendre de l'activité des enzymes qui attaquent les substrats ternaires. Il n'existe pas, en revanche, de corrélation apparente entre la valeur du taux de croissance limite et la structure chimique des hydrates de carbone offerts comme source ternaire.

On doit se demander si le rendement global de la croissance exprime bien le rendement des synthèses, ou si au contraire on ne doit pas, dans l'évaluation de ce dernier, tenir compte de la ration d'entretien. Le seul fait que le rendement global ne varie pas, alors que le taux de croissance varie en fonction de la dilution des aliments, indique déjà que la ration d'entretien doit être extrêmement faible. On peut essayer de l'évaluer en ralentissant expérimentalement le taux de croissance. Même dans ce cas, cependant, on ne parvient pas à mettre en évidence une ration d'entretien mesurable.

D'autre part, les expériences relatives à la croissance totale des cultures en fonction de la concentration initiale de l'aliment ne permettent pas non plus de mettre en évidence une « concentration d'entretien » permettant l'entretien mais non la croissance des cultures. En d'autres termes, il semble difficile de faire apparaître, tout au moins par l'étude du rendement matériel de la croissance, une dépense de source carbonée qui soit réellement indépendante de la croissance. En tous cas le rendement brut paraît bien être indépendant du taux de croissance.

L'expérience montre également que le rendement matériel ne varie pas sensiblement au cours de la croissance et n'est pas plus élevé pendant la « phase d'adolescence » dont un certain nombre d'auteurs croient avoir démontré l'existence.

L'étude du rendement en fonction de la température indique que celui-ci augmente sensiblement quand la température diminue. Cette modification ne peut être due qu'à une modification du rendement des synthèses, puisque la ration d'entretien est certainement négligeable.

L'« accroissement critique » du taux de croissance en fonction de la température paraît être sensiblement le même en présence de différentes sources ternaires. Il ne semble pas que la valeur du taux de croissance soit déterminée par une réaction unique assez lente pour imposer son rythme à toute la chaîne des réactions de synthèse.

Ces différents résultats ont été acquis par l'étude particulière de certaines phases de la croissance. Formulés en une expression ana-

lytique, ils permettent de reconstituer la courbe de croissance. La loi de croissance ainsi établie est pratiquement identique à celle qu'a formulée TEISSIER. Contrairement à la loi logistique, la plus communément admise, elle s'exprime par une courbe fortement dissymétrique. Cette dissymétrie n'est d'ailleurs pas caractéristique de la croissance limitée par l'appauvrissement en aliments. On montre facilement qu'elle doit se retrouver dans bien d'autres cas.

* * *

Il semble, en définitive, que la croissance des cultures bactériennes, tout au moins dans certaines conditions expérimentales, facilement réalisables d'ailleurs, obéisse à quelques lois très simples. Dans ces conditions, et dans ces conditions seulement, l'analyse des courbes de croissance permet de définir et de mesurer certaines constantes physiologiques essentielles. Peut-être le résultat le plus notable de ce travail sera-t-il de permettre d'utiliser avec plus de sûreté et de précision les courbes de croissance pour l'étude de la physiologie bactérienne.



DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE I

Le phénomène de diauxie.

INTRODUCTION

La seconde partie de ce travail est consacrée à l'étude d'un phénomène de croissance complexe qui se manifeste dans les cultures bactériennes, en présence de certains mélanges d'hydrates de carbone. Je m'excuse d'avoir dû, pour désigner ce phénomène, créer un terme nouveau : celui de « diauxie » (croissance double). La suite de cet exposé convaincra, je l'espère, qu'il s'agit bien d'un problème nouveau et défini, qu'il était nécessaire de distinguer par un vocable spécial.

Entre les recherches d'ordre plus général consignées dans la première partie de ce travail et le problème particulier que nous abordons il y a un lien étroit : la mise en évidence du phénomène de diauxie et son étude n'ont été possibles que grâce à l'application constante des méthodes et des résultats qui viennent d'être exposés. Afin de n'avoir plus à y revenir, il convient de souligner que *toutes* les expériences rapportées ci-après ont été faites dans des conditions telles, que les croissances étudiées soient fonction des variations d'une seule condition : la concentration du milieu en aliment ternaire. Aucun autre facteur limitant ne pouvait jouer un rôle dans la croissance.

Les expériences qui vont être décrites sont bien loin de résoudre et d'épuiser les questions posées par l'existence du phénomène de diauxie. Elles ont surtout pour but de définir le mieux possible le

problème, son importance dans la physiologie bactérienne et ses rapports possibles ou probables avec des faits déjà connus. Cet exposé est divisé en trois chapitres. Dans le premier on trouvera la description du phénomène et des conditions dans lesquelles il se manifeste. On a cherché à montrer qu'il exprime des propriétés très générales qui se retrouvent chez des espèces bactériennes variées. Le second chapitre apportera quelques expériences qui permettent de mieux définir la nature du phénomène et, en tous cas, d'écarter un certain nombre d'hypothèses. Dans le dernier chapitre on cherchera à le situer par rapport à des faits déjà connus.

CROISSANCE DU BACILLE SUBTIL DANS UN MÉLANGE
[DE SACCHAROSE ET DE DEXTRENE.

J'ai eu l'occasion d'observer pour la première fois le phénomène de diauxie en étudiant le taux de croissance du *B. subtilis* dans un milieu synthétique contenant un mélange d'hydrates de carbone.

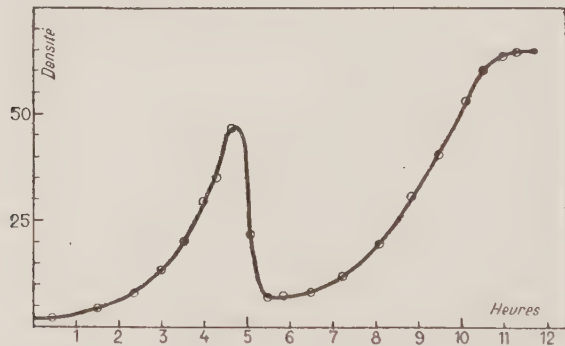


FIG. 33. — Croissance d'une culture de *B. subtilis* en milieu synthétique, en présence d'un mélange de saccharose et de dextrose, le milieu contenant 0,15 p. 1.000 de chaque sucre.

Nous avons vu (chap. IV) qu'en présence de certains mélanges de glucides on obtient une courbe de croissance normale, dont le taux maximum est intermédiaire entre les taux correspondant à chaque constituant du milieu. Le rendement global correspond également à la moyenne des rendements de chaque constituant. En étudiant des mélanges de saccharose et de dextrose j'eus la surprise de constater que la croissance s'exprimait dans ce cas sous une forme complètement aberrante : elle se décomposait en deux poussées bien

distinctes, comprenant chacune toutes les phases d'une croissance normale. Ces deux poussées étaient séparées par une phase de décroissance extrêmement accentuée (fig. 33).

La première hypothèse qui vient à l'esprit en présence d'un tel phénomène, c'est que la souche utilisée n'est pure qu'en apparence, et qu'elle contient en réalité deux races, dont l'une assimile le saccharose, l'autre la dextrine. Il n'est pas utile de décrire les nombreux essais qui furent réalisés pour vérifier cette hypothèse. Nous verrons qu'elle tombe d'elle-même devant l'ensemble des faits. Contentons-nous de souligner que tous les essais de séparation sur milieux solides, de sélection par passages répétés sur saccharose et sur dextrine demeurèrent infructueux et que toutes les souches isolées à partir de la souche primitive se montrèrent identiques à celle-ci dans toutes leurs propriétés, en particulier par celle de donner lieu au phénomène de diauxie, en présence de mélanges de saccharose et de dextrine. Enfin on retrouvait le même phénomène avec des souches de *B. subtilis* d'origine différente.

Avant d'aller plus loin on doit se demander s'il n'existe pas dans la littérature mention d'un phénomène analogue. On est évidemment tenté d'y appliquer l'expression d'« attaque différentielle » employée depuis PASTEUR pour désigner les cas où un micro-organisme manifeste une « préférence » pour l'un des constituants d'un mélange d'isomères optiques. Outre que les courbes de croissance correspondant à ces cas ne sont pas connues et qu'il n'est pas question ici d'isomérisation optique, nous aurons l'occasion de montrer que le terme même d'« attaque préférentielle » ne peut s'appliquer au cas qui nous occupe. On connaît cependant quelques courbes de croissance présentant plusieurs « cycles ». RICHARDS (1932) a étudié avec précision les causes qui donnent cette apparence à la croissance de certaines souches de levure. Son étude montre que le phénomène tient à des influences complexes parmi lesquelles l'action toxique de l'alcool formé joue un rôle prépondérant. Le milieu d'ailleurs ne contenait qu'un seul sucre. JACQUOT (1) a observé, avec des cultures d'*Aspergillus*, et j'ai eu moi-même l'occasion d'observer avec certaines souches microbiennes, que la phase de décroissance des cultures pouvait être suivie dans certains cas d'une

(1) Communication verbale.

légère poussée secondaire, représentant évidemment l'utilisation de certains produits de l'autolyse des cellules. Ce phénomène se rencontre assez couramment et se manifeste en effet sous la forme d'un second « cycle de croissance ». Mais les courbes de croissance auxquelles il donne lieu ne sauraient se confondre avec une courbe de diauxie. La seconde poussée est toujours beaucoup plus faible que la première, ce qui est naturel, et le phénomène n'est nullement lié à la présence dans le milieu d'un mélange d'hydrates de carbone. Dans le cas qui nous occupe, le taux de croissance ne dépendant que de la concentration du milieu en aliment ternaire, aucune action toxique ou autre ne pouvant entrer en ligne de compte, il est évident que le phénomène ne peut être lié qu'à la nature des glucides en présence.

DIAUXIES DU BACILLE SUTIL EN PRÉSENCE
D'AUTRES MÉLANGES.

Il convient donc tout d'abord de rechercher si le phénomène de diauxie peut se produire dans d'autres mélanges, et si une corrélation quelconque se manifeste entre la structure des sucres en présence et son apparition. Pour commencer, on peut étudier la croissance dans une série de mélanges contenant un élément fixe associé à un élément variable. Pour cela on a réalisé une série d'expériences dans lesquelles le saccharose, élément fixe, était associé successivement aux glucides suivants :

Sorbitol	Glucose	Arabinose
Inositol	Mannose	
Mannitol	Fructose	Maltose

liste qui comprend des représentants des principales catégories de glucides. Toutes ces expériences ont été faites dans les conditions habituelles, en milieu synthétique S, additionné des deux sucres à essayer en quantités égales (150 mg. par litre). Dans tous les cas les fioles d'expérience étaientensemencées avec une culture sur milieu S + saccharose de 12 heures environ.

Les résultats sont exprimés par les figures 34 *a, b, c, d*, et 35 *a, b, c, d*, figurant les courbes de croissance du bacille subtil sur ces divers mélanges. On voit que dans une série de cas la croissance est absolument normale, alors que dans tous les autres le phéno-

mène de diauxie se manifeste sous une forme plus ou moins accentuée mais toujours très nette. Les courbes de croissance sont définies avec assez de précision pour qu'il ne puisse y avoir aucune ambiguïté à ce sujet. Si l'on groupe d'une part les sucres qui, associés au

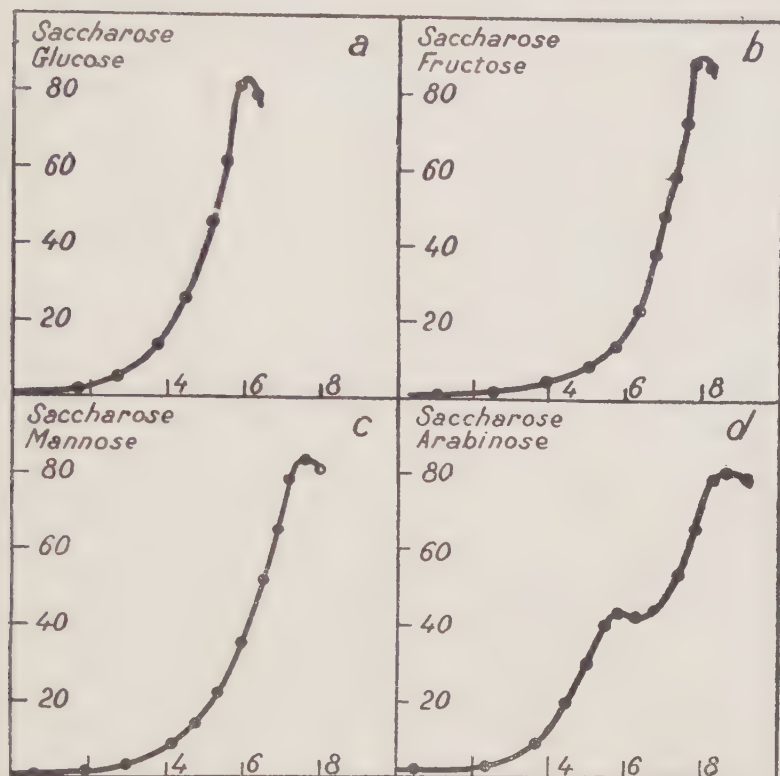


FIG. 34. — Croissance du *B. subtilis* en présence de mélanges de saccharose avec différents glucides.

saccharose, ne donnent pas lieu à une diauxie (A) et d'autre part ceux qui y donnent lieu (B), on forme les deux listes suivantes :

(A)	(B)
—	—
Glucose	Sorbite
Fructose	Inosite
Mannose	Arabinose
Mannite	Maltose
Saccharose	Dextrine

Comme on le voit ces listes contiennent l'une et l'autre des représentants des principaux groupes de glucides. Il ne semble pas au

premier abord que la parenté chimique joue un rôle dans le phénomène, qui paraît tout aussi accentué lorsque le saccharose est associé à un autre disaccharide, comme le maltose, ou à un corps très éloigné, un polyalcool cyclique comme l'inosite. Nous verrons cepen-

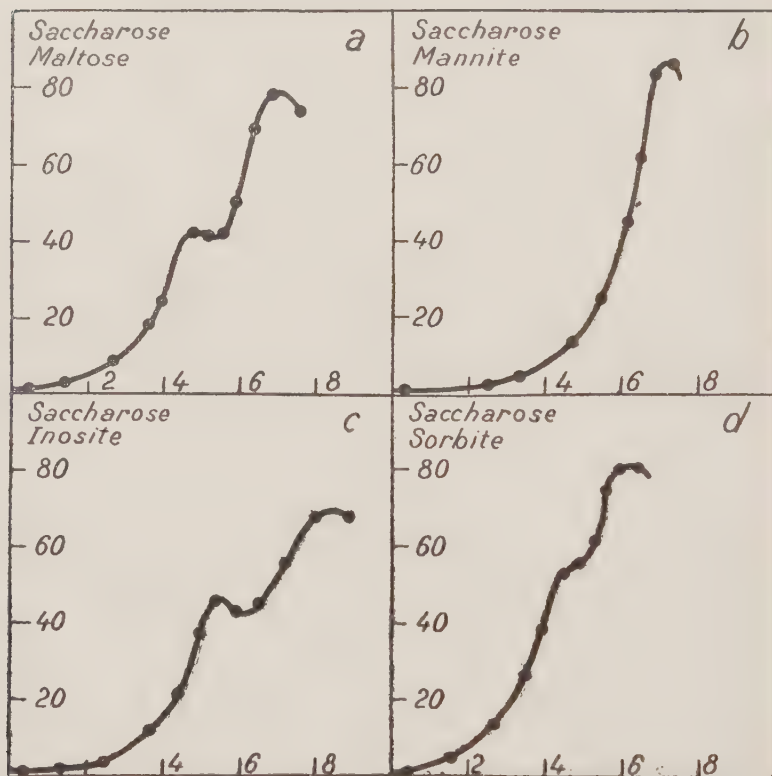


FIG. 35. — Croissance du *B. subtilis* en présence de mélanges de saccharose avec différents glucides.

dant que ces groupements se retrouvent dans d'autres circonstances, et avec d'autres souches bactériennes. Faute de pouvoir les désigner autrement on appellera « sucres A » ceux de la première liste, « B » ceux de la seconde.

DIAUXIES DANS LES MÉLANGES DE SUCRES A ET B.

Jusqu'ici ces deux listes ne reposent que sur le classement obtenu en essayant les divers sucres avec le saccharose. Reste à savoir si la diauxie est liée à la présence de ce dernier sucre, ou si au contraire

elle se produirait dans n'importe quel mélange comprenant un représentant de la liste *A* et un de la liste *B*. Pour résoudre com-

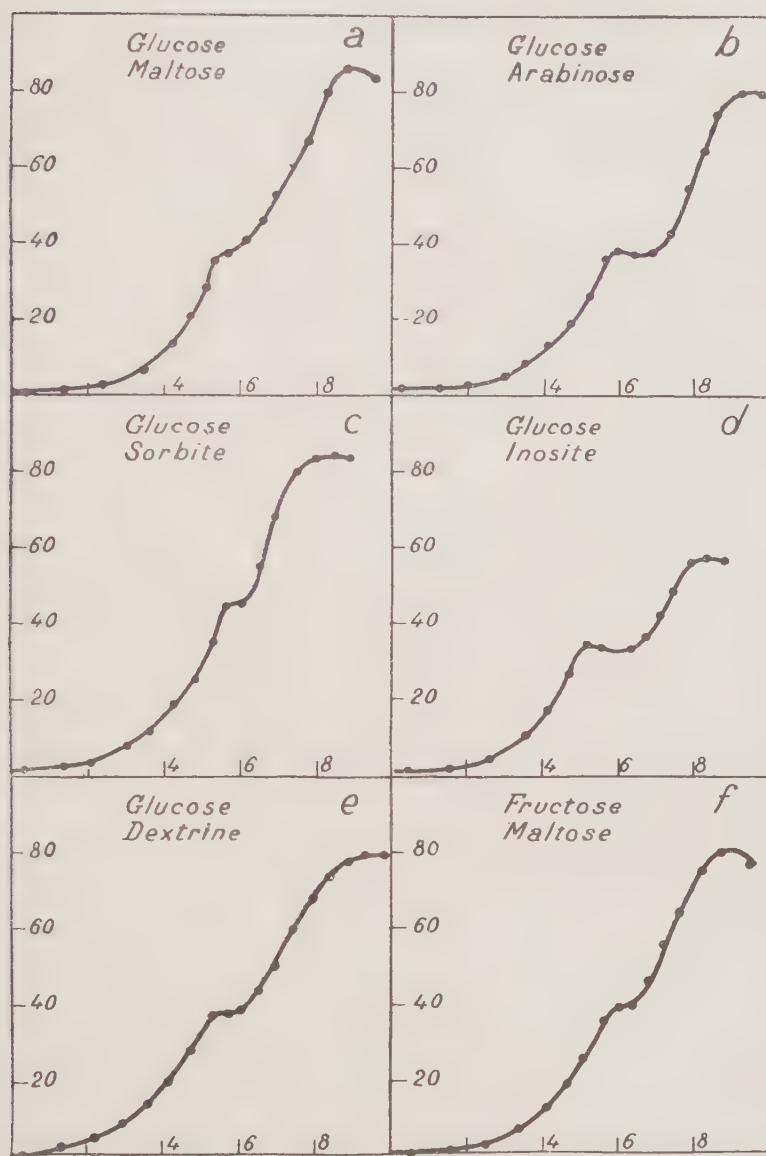


FIG. 36. — Croissance du *B. subtilis* en présence de différents mélanges de deux glucides.

plètement cette question il est nécessaire de réaliser toutes les combinaisons possibles entre les sucres *A* et *B*, c'est-à-dire d'essayer

chaque sucre *A* contre tous les sucres *B*. Les combinaisons du saccharose non comprises, il reste 20 combinaisons à réaliser. Les

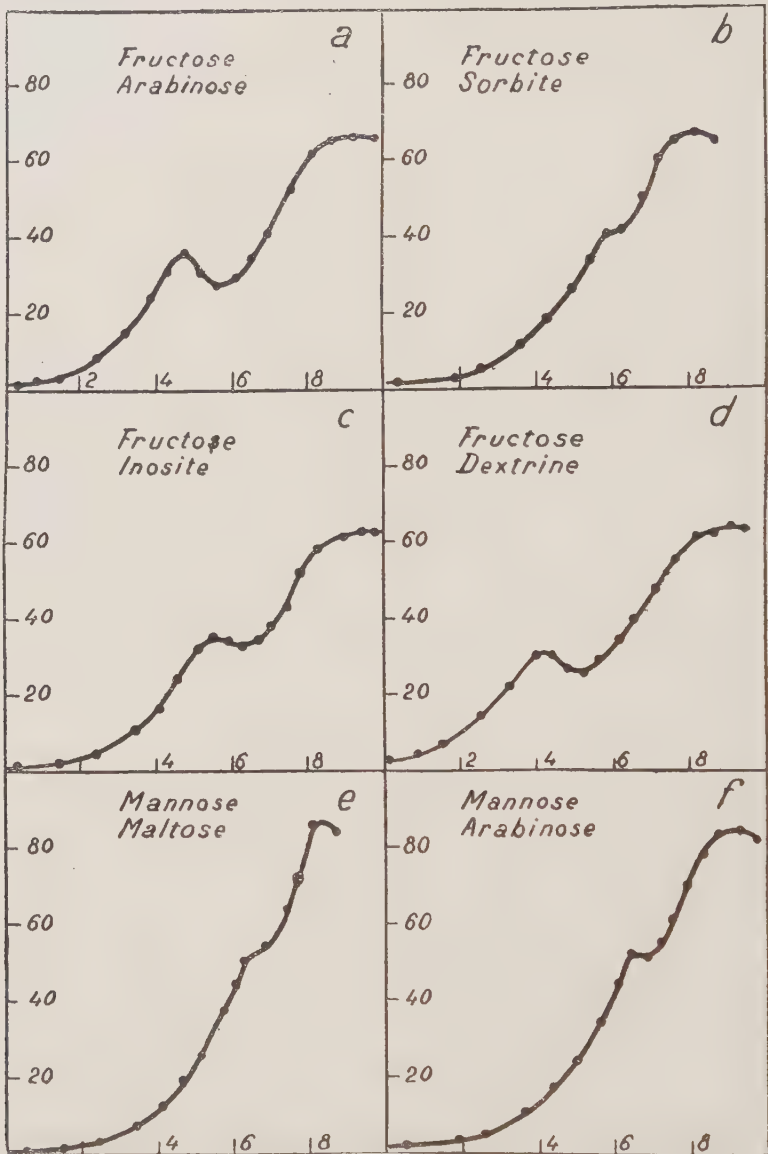


FIG. 37. — Croissance du *B. subtilis* en présence de différents mélanges de deux glucides.

résultats sont exprimés par les figures 36 (*a-f*) 37 (*a-f*) 38 (*a-f*) et 39 (*a,b*). Les expériences sont faites exactement dans les mêmes conditions que les précédentes. On voit que dans *tous* les mélanges

$A \times B$, sans exception le phénomène se manifeste. Il n'atteint pas, il est vrai, la même ampleur que dans le premier exemple (saccha-

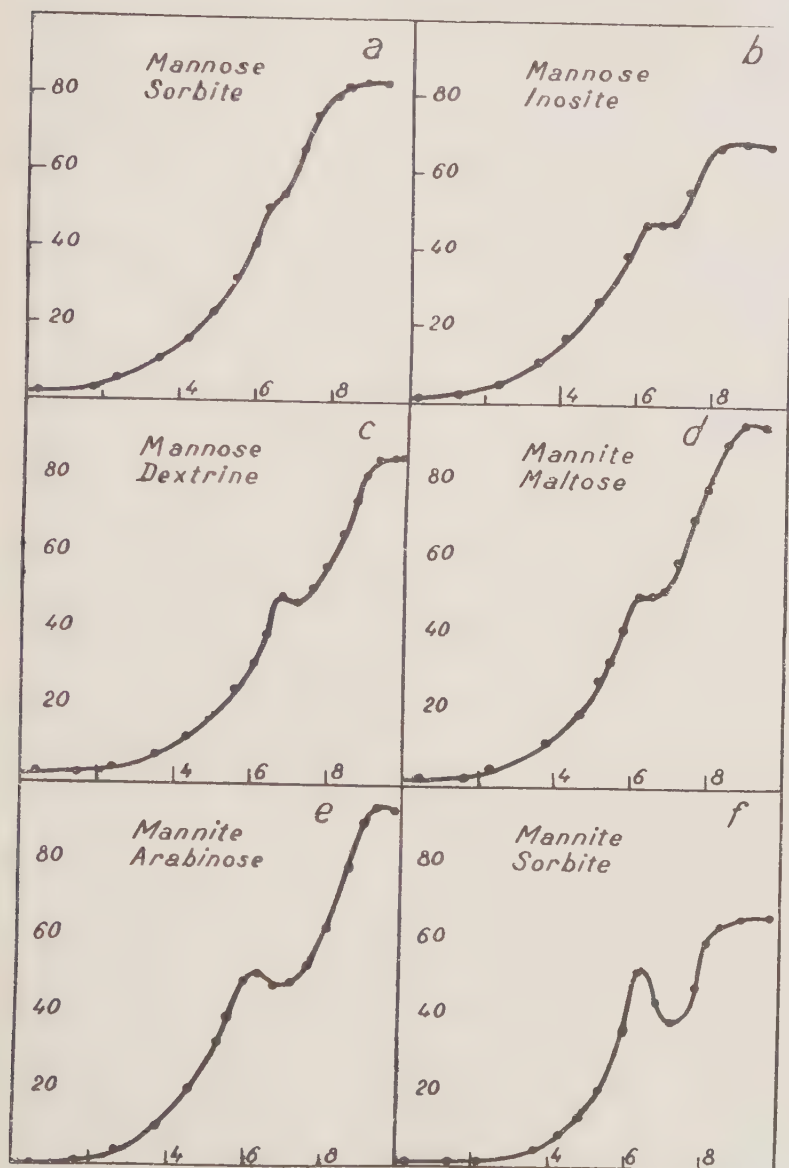


FIG. 38. — Croissance du *B. subtilis* en présence de différents mélanges de deux glucides.

rose-dextrine) et on doit noter que l'aspect des courbes de croissance varie suivant les mélanges considérés. La phase de décrois-

sance, en particulier, est assez irrégulière ; on constate qu'elle est souvent remplacée par un simple palier. Mais il ne peut y avoir de doute sur le fait que la courbe de croissance est dans tous les cas

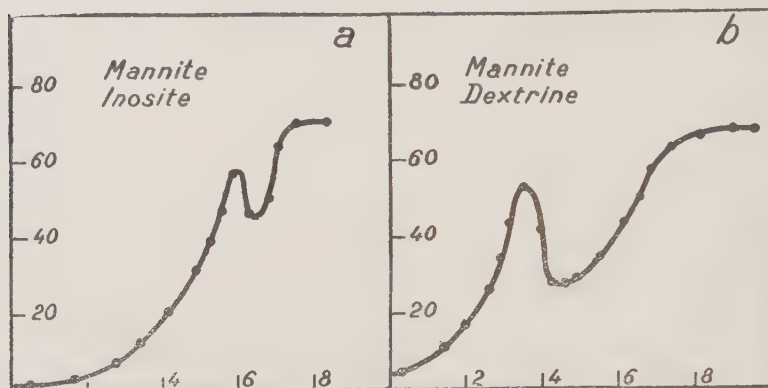


FIG. 39. — Croissance du *B. subtilis* en présence de différents mélanges de deux glucides.

très loin d'une courbe normale et qu'elle comprend deux « poussées » distinctes de croissance : jusqu'ici, par conséquent, tous les sucres *A* se comportent de façon identique vis-à-vis de chaque sucre *B*, et réciproquement.

MÉLANGES DE PLUSIEURS SUCRES *A* OU *B*.

Mais cela n'est pas tout ; il reste à savoir si la diauxie est liée aux mélanges $A \times B$, ou si, au contraire, elle peut se produire dans certains mélanges de sucre *A* entre eux ou de sucre *B* entre eux. Il n'est pas nécessaire pour résoudre cette question de réaliser toutes les combinaisons possibles deux à deux entre sucres *A* d'une part, entre sucres *B* d'autre part. Il est *a priori* vraisemblable que dans les combinaisons $A \times A$ et $B \times B$, la diauxie ne se manifestera pas. C'est du moins ce que font prévoir les combinaisons déjà réalisées avec le saccharose. On peut donc se contenter de vérifier cette hypothèse en associant ensemble plusieurs sucres *A* d'une part, plusieurs sucres *B* d'autre part. La figure 40, courbe I, représente la croissance du Bacille subtil sur un milieu qui contenait à la fois saccharose, mannite, glucose et lévulose, c'est-à-dire quatre sucres *A*. La courbe II correspond à un mélange de quatre sucres *B* : sorbite, inosite, arabinose, dextrine. (Dans les deux cas chaque sucre est

introduit à la concentration de 0,05 gr. par litre). On constate que les courbes de croissance sont absolument normales, il n'y a pas trace de diauxie. Mais ces expériences demandent un contrôle : il s'agit en effet de montrer que la diauxie *peut* se manifester dans des mélanges aussi complexes. C'est ce que prouve l'expérience exprimée par la figure 40, courbe III. Elle correspond à la croissance

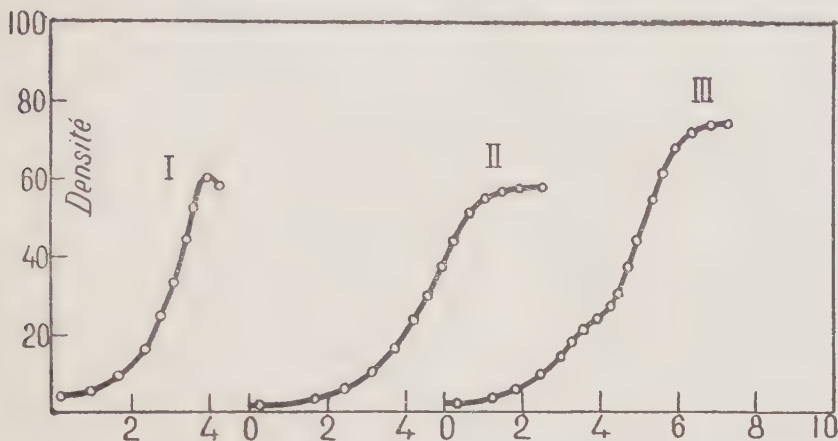


FIG. 40. — Croissance du *B. subtilis* : I) en présence de quatre sucres A ; II) en présence de quatre sucres B ; III) en présence de quatre sucres B plus un sucre A.

d'une culture sur un milieu contenant quatre sucres *B* (sorbite, inosite, arabinose, dextrine) plus un sucre *A* (saccharose). Tous les constituants du mélange sont présents à la dose de 50 mg. par litre. Il se produit, comme on le voit, une diauxie très nette, quoique peu accentuée.

On peut donc conclure de ces dernières expériences que la diauxie ne se produit *jamais* dans des mélanges contenant *uniquement* des sucres *A* ou des sucres *B*.

Enfin on peut montrer que la diauxie apparaît également dans des milieux contenant à la fois de nombreux sucres *A* et *B*. La figure 41 correspond à la croissance d'une culture sur un milieu contenant tous les sucres *A* et tous les sucres *B*, c'est-à-dire 10 en tout (saccharose, glucose, lévulose, mannose, mannite + inosite, sorbite, arabinose, maltose, dextrine) chacun à la concentration de 0,025 gr. par litre. Ici encore la diauxie est parfaitement nette, quoique peu accentuée.

Il ressort de toutes ces expériences, que le classement obtenu

en utilisant le saccharose comme test se retrouve quel que soit le type de mélange réalisé. Tous les sucres *A* se comportent de manière identique vis-à-vis des sucres *B*, et réciproquement. De même chaque groupe semble homogène et ne paraît pas pouvoir se subdiviser. En d'autres termes, il ne semble pas qu'il existe plus de deux groupes, ce qui est particulièrement manifeste dans les mélanges contenant plus de deux sucres : en aucun cas on n'observe

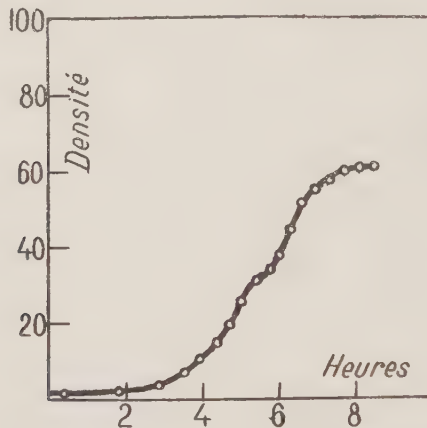


FIG. 41. — Croissance du *B. subtilis* en présence d'un mélange comprenant cinq sucres A et cinq sucres B.

plus de deux cycles successifs. On aboutit à deux catégories distinctes et non, comme on aurait pu s'y attendre, à l'expression de différences plus ou moins graduées. Il semble que tout sucre utilisable par notre souche appartienne nécessairement à la catégorie *A* ou *B*.

DIAUXIES PAR RAPPORT AU GLUCOSE CHEZ *B. coli* ET *B. typhi-murium*.

Telles sont, chez le Bacille subtil, les conditions dans lesquelles se manifeste le phénomène de diauxie. Avant même d'essayer d'en préciser la nature et le mécanisme, il est d'un intérêt primordial de savoir s'il s'agit d'un phénomène général, si, en utilisant d'autres espèces bactériennes, on retrouve ce classement des sucres en deux catégories et si les mêmes corps se trouveront associés dans les listes *A* et *B*.

Les expériences qui suivent se rapportent à la croissance de deux

bactéries proches l'une de l'autre, mais très éloignées par tous leurs caractères de *B. subtilis*. Ce sont *B. coli* et *B. typhi-murium*. Ces

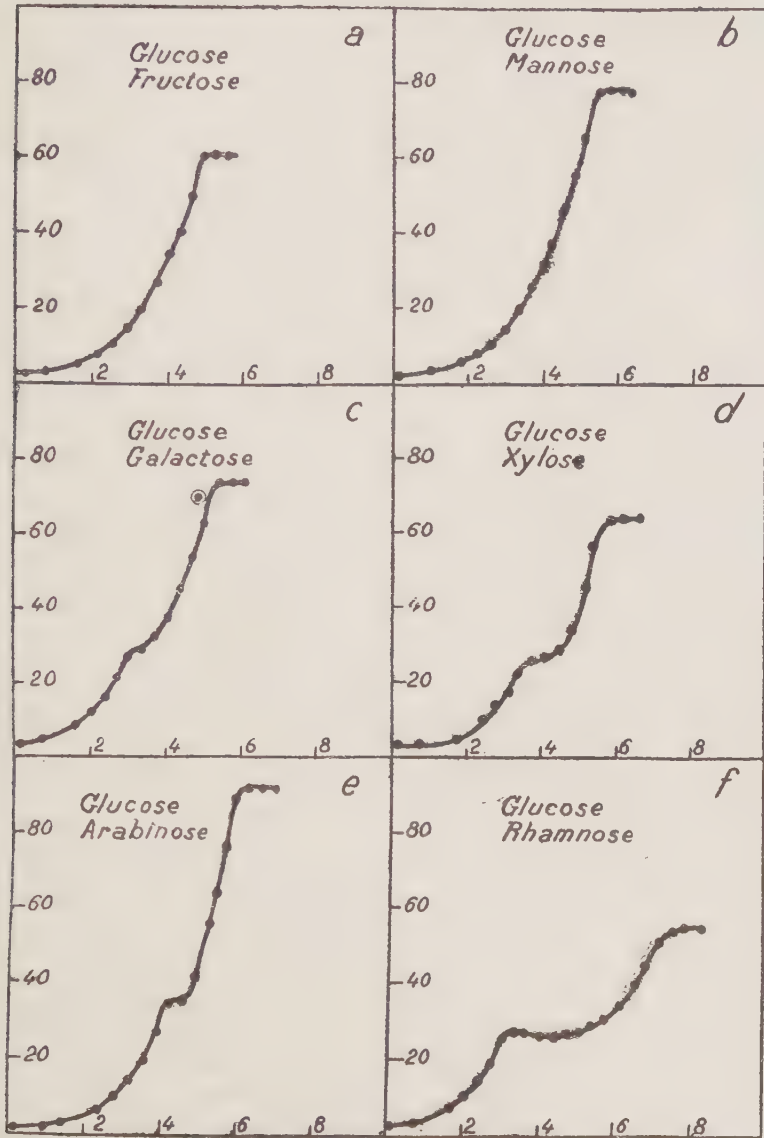


FIG. 42. — Croissance du *B. coli* en présence de mélanges de glucose avec différents glucides.

deux souches n'attaquaient pas le saccharose. Le glucose a donc été employé pour effectuer un premier classement. Les sucres éprouvés par rapport au glucose ont été les suivants :

Hexoses : Glucose
Fructose
Mannose
Galactose

Pentoses : Arabinose
Xylose
Rhamnose

Hexites : Mannite
Sorbite
Dulcité

Disaccharides : Maltose
Lactose

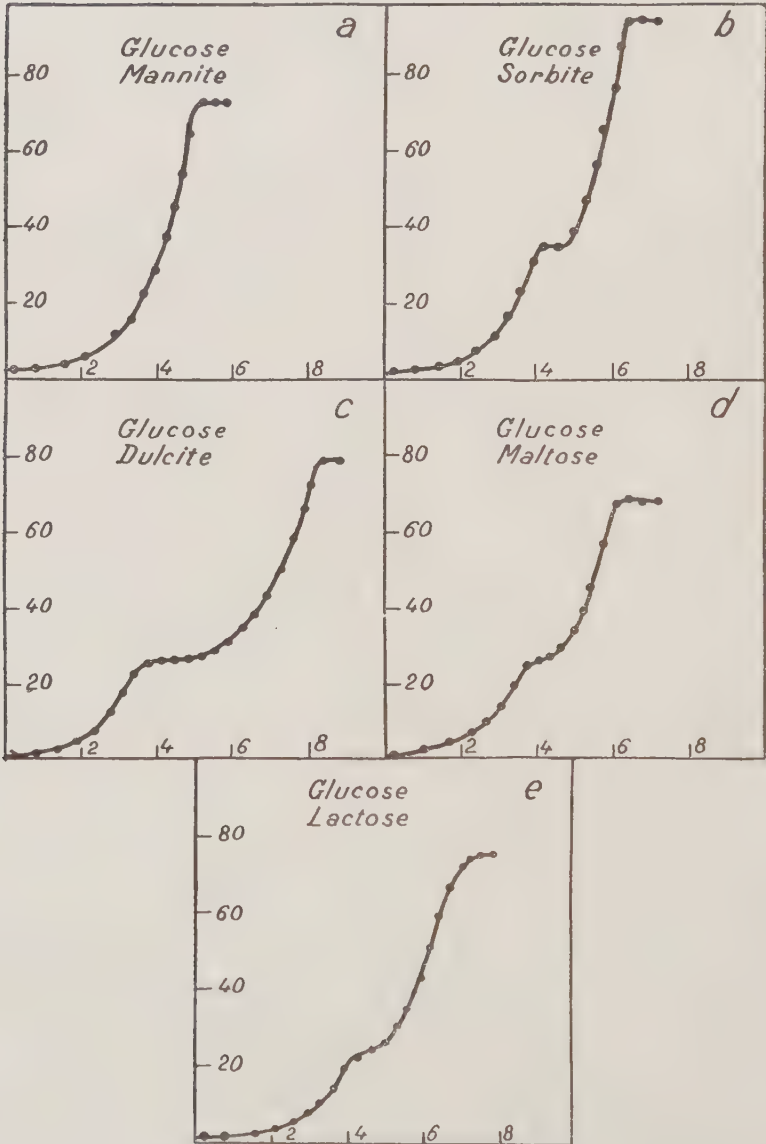


FIG. 43. — Croissance du *B. coli* en présence de mélanges de glucose avec différents glucides.

Toutes ces expériences ont été faites dans les mêmes conditions que les précédentes. Les fioles étaient ensemencées avec des cul-

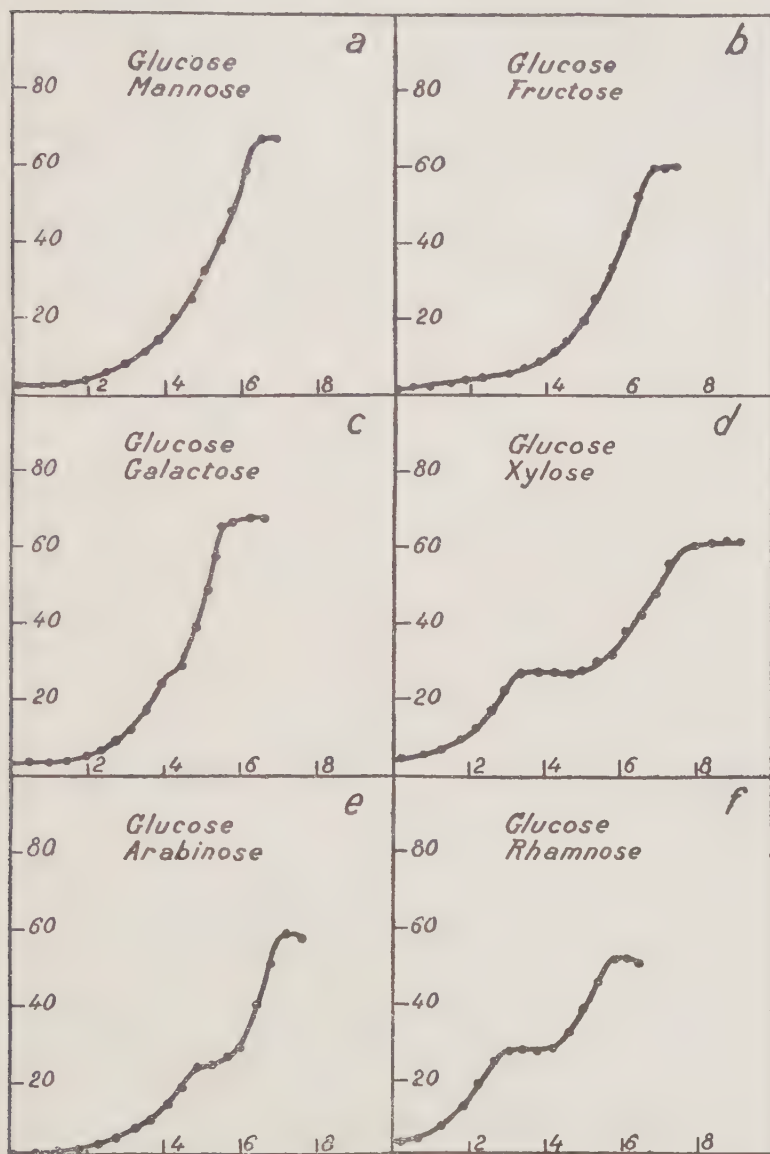


FIG. 44. — Croissance du *B. typhi-murium* en présence de mélanges de glucose avec différents glucides.

tures sur milieu *S* + glucose de 12 heures environ. Le milieu contenait 75 mg. par litre de glucose et 150 mg. par litre du sucre à

essayer (1). Les résultats, en ce qui concerne *B. coli*, sont exprimés par les figures 42 (a-f) et 43 (a-e) et pour *B. typhi-murium*, par les figures 44 (a-f) et 45 (a-d).

On voit que les résultats sont entièrement superposables, qu'il s'agisse de *B. coli* ou de *B. typhi-murium*. On remarquera que chez

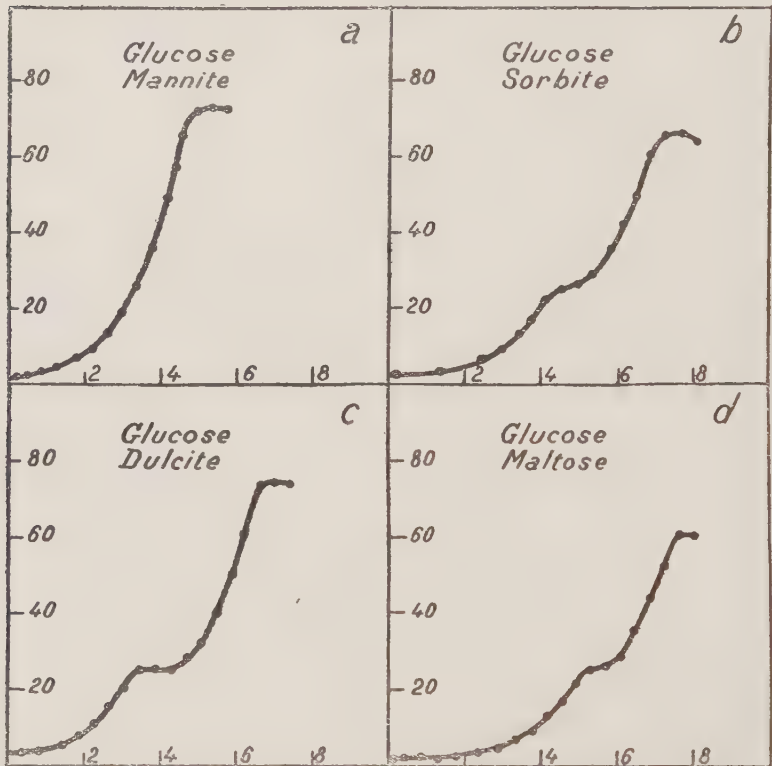


FIG. 45. — Croissance du *B. typhi-murium* en présence de mélanges de glucose avec différents glucides.

l'une et l'autre espèce les deux poussées successives des croissances diauxiques sont séparées en général par un palier et non, comme chez *B. subtilis*, par une phase de décroissance. Nous avons déjà eu l'occasion de noter d'ailleurs (p. 42) que les courbes de croissance normale de *B. subtilis* en milieu synthétique présentent une phase maximum extrêmement courte, à tel point qu'il est difficile de

(1) Sauf dans deux cas (tests de l'Arabinose et de la Sorbite avec *B. coli*) où le milieu contenait 200 mg. de sucre à essayer et 100 mg. de glucose.

définir dans certains cas le maximum avec précision, alors que chez *B. coli* la phase de décroissance est très lente à s'établir. Il est naturel que ces différences s'expriment également dans les courbes diauxiques, et on peut noter en passant qu'elles mettent bien en évidence le fait que la première poussée, dans ces courbes, aboutit à un véritable maximum, comparable à celui d'une croissance normale. Cependant, si dans certains cas le palier qui sépare les deux poussées successives est particulièrement net (glucose-dulcité par exemple), il disparaît parfois, pour ne se manifester que par un simple ralentissement (glucose-galactose). Mais les croissances normales et les croissances diauxiques ne sauraient se confondre.

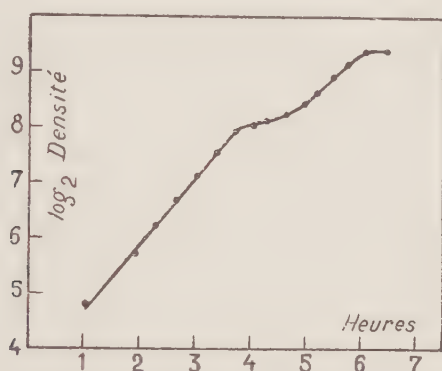


FIG. 46. — Croissance d'une culture de *B. coli* dans un mélange glucose-galactose. (Coordonnées semi-logarithmiques).

Même lorsqu'il n'y a pas de palier accentué, celles-ci peuvent être caractérisées par le fait que le *taux de croissance* passe par un *minimum*. Cela est particulièrement évident lorsqu'on représente les croissances diauxiques en coordonnées semi-logarithmiques (fig. 46).

Le fait essentiel, c'est que le classement des sucres vis-à-vis du glucose s'établit comme suit, pour *B. coli* et *B. typhi-murium* :

A	B
Glucose	Galactose
Mannose	Arabinose
Fructose	Xylose
Mannite	Rhamnose
	Sorbité
	Dulcité
	Maltose
	Lactose

Et on constate que la liste des sucres *A* établie avec *B. subtilis* se retrouve intégralement ici, au saccharose près, qui n'est pas utilisable par *B. coli* et *typhi-murium*. La liste *B* est assez différente en apparence, mais cela tient uniquement à ce qu'elle comprend plusieurs corps que *B. subtilis* n'attaquait pas (galactose, xylose, dulcité, rhamnose, lactose) et qu'elle ne comprend pas l'inosite, auquel *B. coli* et *B. typhi-murium* ne touchent pas (1). Trois corps, également utilisables par ces trois espèces bactériennes, se retrouvent dans la liste *B* : arabinose, sorbite et maltose.

AUTRES COMBINAISONS RÉALISÉES AVEC *B. coli*.

Ainsi, non seulement le phénomène de diauxie paraît très général, puisqu'il se présente chez des espèces bactériennes très éloignées mais encore il semble que les *mêmes* corps soient toujours classés *ensemble*, en deux catégories distinctes. Il importe de savoir jusqu'où cette identité se poursuit, et en particulier si les listes *A* et *B* sont entièrement homogènes, si tous les sucres de chaque liste manifestent les mêmes propriétés. Pour cela on a réalisé toutes les combinaisons possibles entre un certain nombre de sucres, comprenant des représentants des listes *A* et *B*. Le nombre total de sucres essayés a été limité à huit corps, ce qui donne déjà 27 combinaisons qui ont toutes été expérimentées. Les sucres essayés comprenaient 4 sucres *A* et 4 sucres *B* choisis à dessein parmi des catégories chimiques différentes :

A	B
—	—
Mannite	Sorbite
Glucose	Xylose
Fructose	Maltose
Mannose	Lactose

Les expériences ont été faites avec *B. coli*, dans des conditions identiques aux précédentes. (Ensemencement des fioles avec cultures sur milieu *S* + glucose). Pour les mélanges $A \times B$, le milieu contenait toujours une partie de sucre *A* pour 3 de sucre *B* (75 mg. et

(1) La dextrine se classe également parmi les sucres *B* pour *B. coli*. Mais l'identité chimique de ce corps est trop mal définie pour qu'il soit intéressant de le faire figurer dans les classements.

150 mg. par litre). Les résultats exprimés par les figures 47 (a-f), 48 (a-f), 49 (a-f) et 50 (a-c) ne comprennent pas les combinaisons du

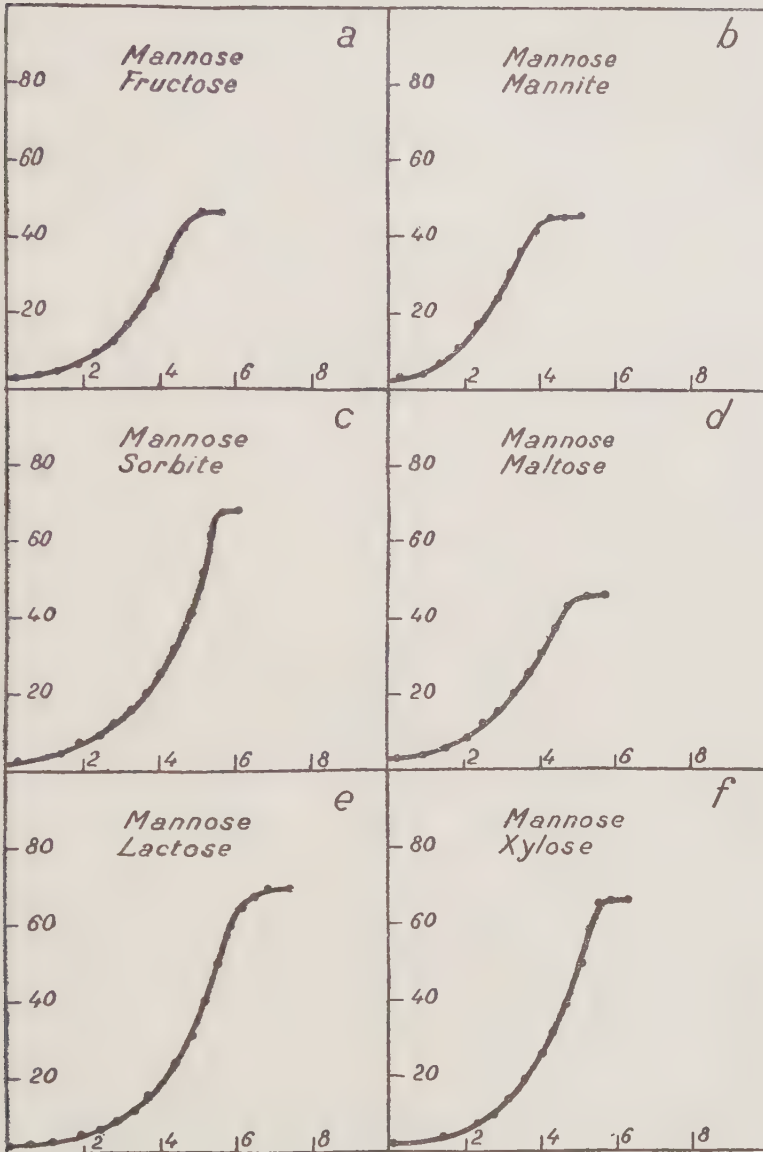


FIG. 47. — Croissance du *B. coli* en présence de différents mélanges de deux glucides.

glucose, déjà réalisées dans les expériences précédentes. On peut voir qu'en aucun cas la confusion n'est possible entre croissance

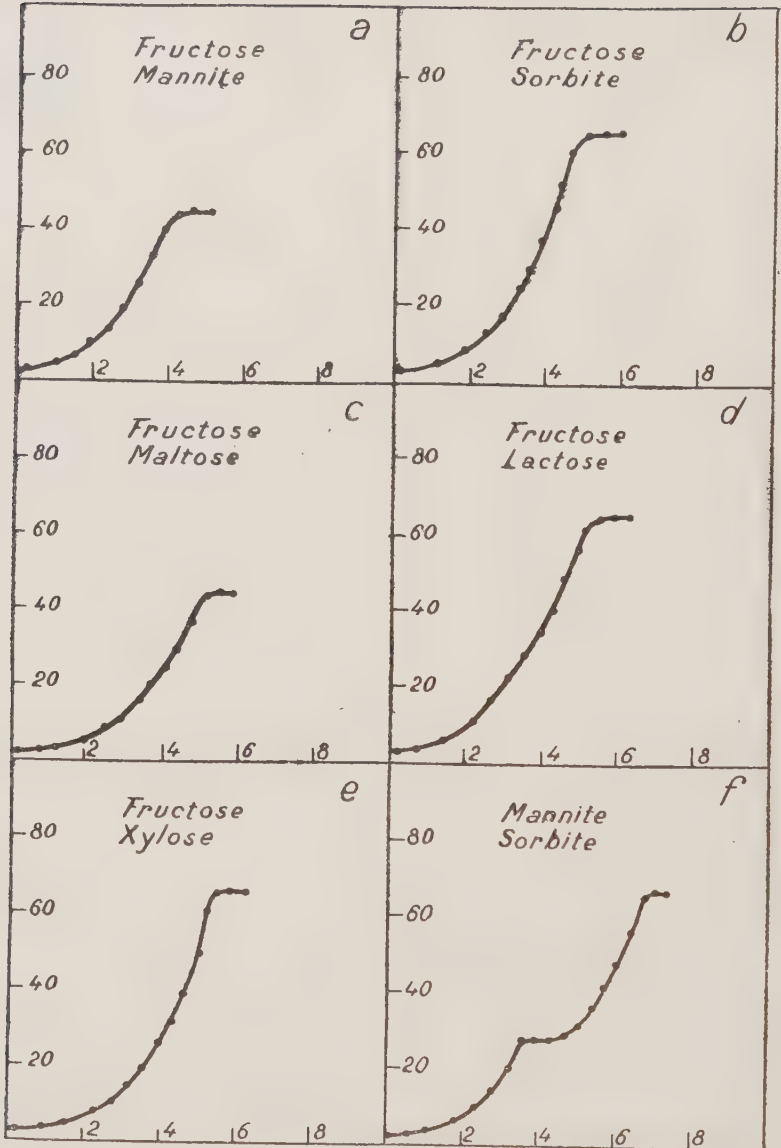


FIG. 48. — Croissance du *B. coli* en présence de différents mélanges de deux glucides.

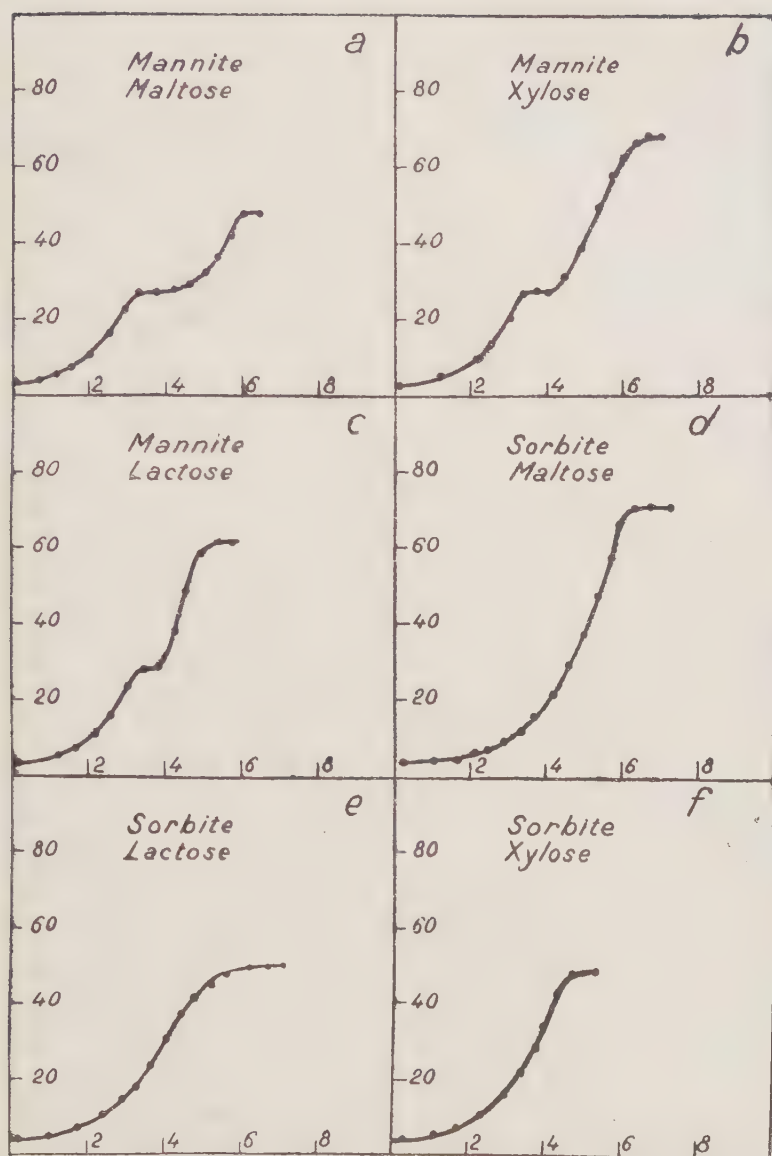


FIG. 49. — Croissance du *B. coli* en présence de différents mélanges de deux glucides.

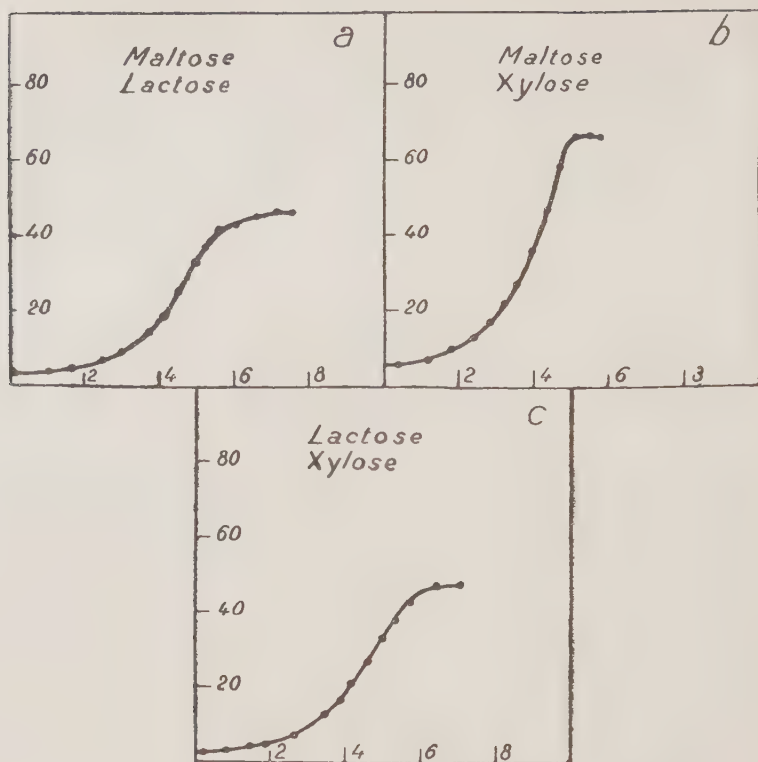


FIG. 50. — Croissance du *B. coli* en présence de différents mélanges de deux glucides.

diauxique et croissance normale. Ces résultats sont résumés par le tableau suivant, le signe + indiquant une croissance diauxique, et le signe — une croissance normale :

TABLEAU XXX.

Glucose	Gluc.								
Mannose	—	Mann.							
Fructose	—	—	Fruct.						
Mannite	—	—	—	Mann.					
Sorbite	+	—	—	+	Sorb.				
Maltose.	+	—	—	+	—	Malt.			
Lactose	+	—	—	+	—	—	Lact.		
Xylose	+	—	—	+	—	—	—	Xyl.	

L'examen de ce tableau révèle qu'en aucun cas un mélange de deux sucres *A*, ou de deux sucres *B*, ne donne lieu à une croissance diauxique, et que *tous les sucres B* donnent des croissances diauxiques en présence de mannite ou de glucose. Ces résultats sont identiques à ceux qu'on avait obtenus avec *B. subtilis*. Mais il apparaît aussi une différence très importante : le fructose et le mannose, sucres *A*, ne donnent de diauxie dans aucun mélange avec des sucres *B*. Nous avons vu qu'il n'en était pas ainsi chez *B. subtilis*, qui présentait des courbes diauxiques en présence de n'importe quel mélange $A \times B$. Pour *B. coli*, au contraire, les sucres de la liste *A* ne sont pas tous équivalents : certains d'entre eux ne provoquent en aucun cas le phénomène de diauxie.

Discussion.

Le classement des sucres.

La différence importante que nous venons de relever doit-elle nous faire abandonner le classement des sucres en deux catégories, *A* et *B* ? Cela ne paraît pas opportun, et il est certainement préférable de conserver ce classement qui paraît bien indiquer l'identité de certains mécanismes physiologiques chez les diverses espèces bactériennes expérimentées. Certes, à ne considérer que les résultats concernant *B. coli*, on pourrait créer une troisième catégorie de sucres : « indifférents », ne donnant de diauxie ni en présence des sucres *A* ni en présence des sucres *B*, catégorie qui n'existerait pas chez *B. subtilis*. Mais, plutôt que de souligner des différences, il vaut beaucoup mieux marquer les analogies, qui deviennent évidentes lorsqu'on adopte la définition suivante : les sucres *A* sont ceux qui, en présence du glucose, ne provoquent pas de croissance diauxique, les sucres *B* ceux qui, dans les mêmes conditions, donnent lieu à ce phénomène. Le classement ainsi défini est le même pour tous les sucres utilisables à la fois par *B. coli*, *B. subtilis*, et *B. typhimurium*. En groupant les résultats donnés par ces deux espèces bactériennes, on obtient le classement général suivant :

	B
Glucose	Galactose
Fructose	Arabinose
Mannose	Xylose
Mannite	Rhamnose
Saccharose	Sorbite
	Dulcite
	Inosite
	Maltose
	Lactose

Indépendamment de toute hypothèse sur le mécanisme de la diauxie, on doit d'abord se demander si ce classement correspond à la structure ou aux propriétés chimiques des corps en présence. Au point de vue purement chimique, on voit que les deux séries comportent des représentants de tous les principaux groupes de glucides : la série *A* comprenant trois hexoses, un hexite et un disaccharide, la série *B* un hexose, deux pentoses, un méthyl-pentose, deux hexites, un alcool cyclique et deux disaccharides. Il n'y a évidemment rien à trouver dans cette voie. S'agit-il d'une analogie plus profonde de structure ? On constate que si tous les sucres de la liste *A* sont des représentants de la *D*-série, la liste *B* comporte une majorité de corps appartenant également à cette série. Le glucose, le mannose, la mannite, sucres *A*, sont dextrogyres, mais le fructose, également sucre *A*, est lévogyre. L'examen approfondi des formules de structure ne révèle rien de plus.

On devait se demander si la diauxie ne pouvait être liée à quelque altération subie par certains sucres au cours de la stérilisation et non par d'autres. Cette hypothèse a été contrôlée à plusieurs reprises : on a comparé les croissances obtenues lorsque les deux constituants d'un mélange étaient : 1^o stérilisés à part, dans de l'eau distillée (technique habituelle) ; 2^o stérilisés dans le milieu, ou, 3^o introduits dans les flacons de culture sans avoir subi de stérilisation. Les résultats se sont montrés identiques dans tous les cas. La diauxie est donc certainement liée aux propriétés *normales* des sucres.

Malgré les résultats négatifs de ce premier examen, la question ne doit pas être considérée comme insoluble. Le fait que la diauxie permette d'établir les mêmes groupements de sucres, lorsque les expériences sont faites avec des bactéries aussi différentes que *B. coli* et *B. subtilis*, indique clairement que ces classements ne cor-

respondent pas seulement aux idiosyncrasies physiologiques des bactéries, mais aussi, certainement, à quelque propriété chimique ou physique commune aux corps appartenant à l'une des catégories.

Il est un point qui doit attirer l'attention et donne une indication qui ne saurait être négligée : c'est le groupement au sein de la liste A des trois hexoses : glucose, fructose et mannose. On sait, en effet, que ces trois corps sont toujours ou presque associés par leurs propriétés fermentaires. Ces étroites analogies ont été démontrées il y a longtemps déjà par les travaux de FISCHER et THIERFELDER (1898) sur les levures : il semble que toute souche de levure capable d'attaquer l'un de ces trois corps soit toujours capable d'attaquer les deux autres. Le résultat est si constant que, pour la détermination des levures par leurs réactions fermentaires, on admet qu'il est inutile d'essayer les trois représentants de ce groupe. Chez les bactéries, cette règle souffre quelques exceptions, mais elles sont rares (KENDALL, BLY et HANER 1923 ; KENDALL 1928 ; WEDUM et GOLDEN 1937). Or ces trois sucres, comme l'ont remarqué FISCHER et THIERFELDER, ont une propriété chimique commune : celle de former le même émol. Aussi ARMSTRONG (1912) a-t-il supposé que les microorganismes pouvaient produire l'émolisation avant d'attaquer ces corps. En tous cas l'association de ces trois corps au sein de la liste A est bien en accord avec l'identité de leurs propriétés fermentaires. Celles-ci cependant ne suffisent pas à expliquer la composition de la liste A, puisque cette catégorie comprend, outre les trois hexoses en question, le saccharose et la mannite. Quoi qu'il en soit ces coïncidences doivent être notées.

Diauxie et constantes de croissance.

S'il n'apparaît aucune corrélation évidente entre les propriétés chimiques des sucres et leur classement vis-à-vis du phénomène de diauxie, il n'est peut-être pas impossible de découvrir une corrélation avec d'autres propriétés physiologiques. On peut en particulier considérer les constantes de croissance caractéristiques de ces différents corps.

Le rendement, on le sait, est peu variable, et on trouve dans les deux listes des sucres à rendement élevé et à rendement faible. Le taux de croissance maximum ne permet pas d'établir de rapport plus précis : si la plupart des sucres donnant un faible taux de crois-

sance se trouvent réunis dans la liste *B*, celle-ci comprend aussi des corps permettant une croissance aussi rapide, ou plus rapide, que certains sucres *A*. Ainsi le taux de croissance de *B. coli* est de 1,04 sur le fructose et le mannose (*A*), de 1,10 sur la sorbite (*B*), de 1,09 sur l'arabinose (*B*). Le taux de croissance de *B. subtilis* est de 1,25 sur la sorbite (*B*) et de 1,21 sur le glucose (*A*).

Il ne semble donc pas qu'il y ait de corrélation entre les propriétés physiologiques exprimées par ces deux constantes et celles qui sont liées au phénomène de diauxie. En revanche on doit noter que la troisième constante de croissance, celle que nous avons désignée par le symbole C_1 (concentration d'aliment limitant pour laquelle le taux de croissance maximum est réduit de moitié), paraît avoir toujours une valeur plus élevée pour les sucres *B* que pour les sucres *A* dans les courbes de croissance de *B. subtilis*. On constate en effet que la phase de ralentissement des courbes de croissance est toujours plus arrondie et se termine moins brutalement avec les sucres *B* qu'avec les sucres *A* (voir p. 127) (Comparer à ce sujet les croissances représentées par les courbes I et II de la fig. 40). Cette corrélation doit être notée, quoiqu'elle soit d'interprétation difficile, et qu'elle ne se manifeste pas clairement dans les courbes de croissance de *B. coli*. On se rappellera à ce sujet que la constante C_1 exprime une des caractéristiques physiologiques d'un phénomène analogue à une saturation.

Résumé et conclusions du Chapitre premier.

En présence de mélanges de certains hydrates de carbone, la croissance des cultures bactériennes est anormale. Elle est interrompue par une phase de ralentissement ou d'arrêt, ou même de décroissance. Quelle qu'en soit la forme précise, ces courbes de croissance peuvent toujours être caractérisées par le fait que le taux de croissance passe à un moment donné par un minimum. C'est à ce phénomène que l'on donne ici le nom de « diauxie ».

Dans ce premier chapitre on ne s'est pas préoccupé d'élucider le mécanisme de la diauxie, mais d'établir qu'il s'agit d'un phénomène général, que peuvent manifester des espèces bactériennes très différentes. L'étude systématique des mélanges d'hydrates de carbone provoquant ou ne provoquant pas de diauxie, permet d'établir

empiriquement deux catégories de sucres et deux seulement. En effet, quelle que soit la complexité du mélange étudié, on n'observe jamais plus de deux poussées successives de croissance. Nous appelons sucres *A* ceux qui, en présence de glucose, ne provoquent pas de diauxie, et sucres *B* ceux qui, dans les mêmes circonstances, donnent lieu à ce phénomène. Il se trouve que les classements établis en étudiant les réactions d'espèces bactériennes très différentes : *B. coli* et *B. subtilis*, sont analogues : les mêmes corps sont associés dans les listes *A* et *B*. Cela indique que la diauxie est l'expression de propriétés constantes et essentielles des souches bactériennes vis-à-vis des sucres essayés. Toutefois, il n'existe aucune corrélation évidente entre la structure chimique de ces corps et leur place dans les catégories *A* ou *B*. Il ne semble pas non plus qu'il y ait de rapport entre le phénomène de diauxie et les propriétés physiologiques exprimées par les principales constantes de croissance : taux maximum et rendement.



CHAPITRE II

La nature du phénomène de diauxie.

Jusqu'ici on s'est borné à décrire le phénomène de diauxie, à montrer qu'il est lié à la présence simultanée dans le milieu de certains hydrates de carbone, sans toutefois faire d'hypothèses sur son mécanisme. On décrira dans ce chapitre un certain nombre d'expériences qui permettront de mieux définir le phénomène, et montreront dans quelle voie on doit chercher à élucider son mécanisme.

L'ASSIMILATION SUCCESSIVE DES SUCRES DANS LA DIAUXIE.

Il est à peu près évident que les deux poussées successives d'une diauxie correspondent à l'assimilation successive des deux éléments du mélange de glucides constituant la source carbonée. Toutefois, avant d'aller plus loin, il est nécessaire de démontrer par quelques expériences qu'il en est bien ainsi. Cela est possible sans dosages, par la comparaison des courbes de croissance obtenues en présence de différentes proportions du même mélange. C'est ce qui permet de faire l'expérience résumée par la figure 51. Celle-ci correspond à la croissance de trois cultures de *B. coli* sur un mélange de glucose et de sorbite. (Expérience faite dans les conditions habituelles, ensemencement des fioles avec une culture entretenue sur milieu *S* + glucose). Dans le premier cas (courbe *A*) le milieu contenait 1 partie de glucose pour 3 de sorbite (200 mg. de sucre en tout) dans le second (courbe *B*) 2 parties de glucose pour 2 de sorbite, et dans le dernier (*C*) 3 parties de glucose pour une de sorbite. Les rendements de ces deux sucres étant comparables, si l'hypothèse est exacte, le palier marquant la fin du premier cycle doit correspondre dans un cas au quart de la croissance totale, dans le second à la moitié, et dans

l'autre aux trois quarts. C'est bien ce que l'on constate, en effet, et on peut en outre déduire de ces courbes que c'est le glucose qui est

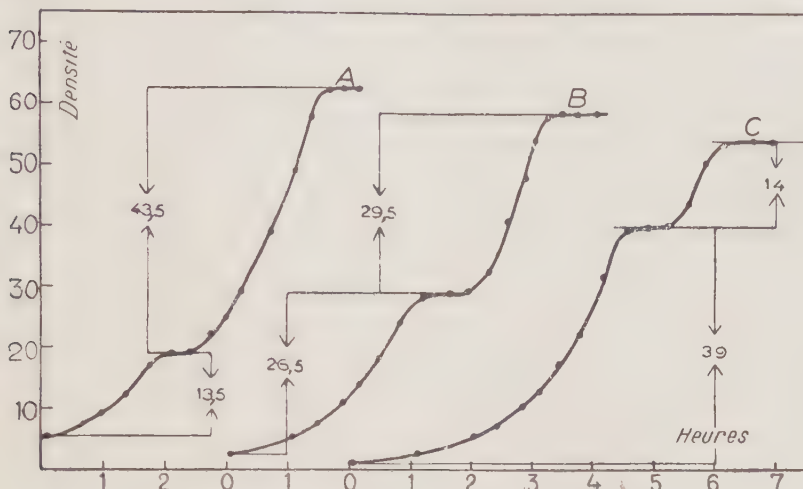


FIG. 51. — Croissance du *B. coli* dans un mélange glucose-sorbitol, en proportion 1/3 (A) ; 2/2 (B) et 3/1 (C). Les chiffres indiquent la croissance totale correspondant à chaque « cycle de croissance ».

assimilé le premier. Les résultats sont du reste d'une précision quantitative : la croissance totale correspondant à la première poussée dans chacune de ces courbes est de :

Expérience :	I	II	III
Observé	13,5	26,5	39,0
Moyenne calculée	13,15	26,2	39,5

On voit que l'écart par rapport à la moyenne ne dépasse pas les erreurs possibles. Il en est de même pour la seconde poussée :

Expérience :	I	II	III
Observé	43,5	29,5	14,0
Moyenne calculée	43,5	29,0	14,5

Et l'on constate que, comme nous le savions déjà (p. 54), le rendement de la sorbite est supérieur à celui du glucose.

On peut conclure de ces résultats que le glucose est *entièrement utilisé* pendant le premier cycle, la sorbite entièrement utilisée également pendant le second. Reste à savoir s'il en est toujours ainsi, et en particulier si le sucre *A* est toujours utilisé le premier. En ce qui concerne *B. coli*, rappelons que, dans les expériences rapportées au chapitre précédent, le sucre *A* et le sucre *B* ont chaque fois été introduits dans le milieu dans la proportion de 1 à 2. Les rendements des sucres essayés étant comparables, si le sucre *A* est toujours utilisé avant le sucre *B*, le palier correspondant à la fin du premier cycle doit toujours se trouver au tiers environ de la croissance totale. On peut constater (fig. 42, 43, 47, 48, 49, 50) qu'il en est bien ainsi.

En ce qui concerne *B. subtilis*, l'expérience résumée par la figure 52 montrera que là aussi l'un des cycles correspond au

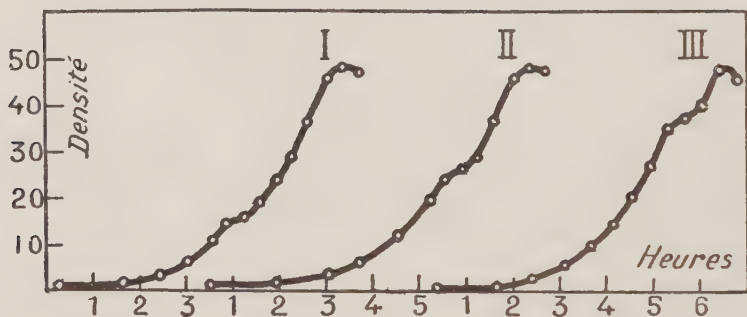


FIG. 52. — Croissance de *B. coli* dans un mélange saccharose-maltose, en proportion 1/3 (I), 2/2 (II) et 3/1 (III).

sucres *A* et *B*. Ce graphique exprime la croissance de trois cultures sur un mélange de saccharose et de maltose, dans les proportions de 1 à 3 dans le premier cas, de 1 à 1 dans le second, de 3 à 1 dans le dernier. On constate qu'ici aussi le sucre *A*, en l'espèce le saccharose est utilisé le premier (1). Enfin des expériences de dosage qui seront décrites plus loin permettent de préciser ces résul-

(1) On doit noter que la position des maxima successifs est toujours plus variable avec *B. subtilis* qu'avec *B. coli*. Nous avons dû remarquer ce fait en étudiant la croissance totale des cultures de cette bactérie en fonction de la concentration initiale de l'aliment (1^{re} partie, Chap. III).

tats et d'affirmer que le sucre *B* n'est jamais, *même partiellement*, utilisé pendant le premier cycle, alors que le sucre *A* est toujours *entièrement épuisé* à la fin du premier.

DIAUXIE ET « ATTAQUE PRÉFÉRENTIELLE ».

Il est donc établi que les courbes diauxiques expriment le fait que les glucides appartenant à une certaine catégorie sont toujours assimilés avant certains autres lorsqu'ils se trouvent en présence au sein du même milieu de culture. Ce point précisé, nous sommes en mesure de rechercher quels sont les principaux types d'explication capables de rendre compte de ces faits. Avant d'envisager des hypothèses plus précises, il convient d'examiner celle d'une « attaque préférentielle » qui paraît la plus immédiate. Il est clair que cette expression ne constitue pas, à vrai dire, une hypothèse, et qu'elle ne comporte aucune explication positive du mécanisme du phénomène. Mais il est clair également qu'elle ne peut même pas être employée pour *décrire* les faits impliqués par les courbes diauxiques, dont elle donnerait une idée incorrecte. Tout d'abord parce qu'elle a jusqu'ici été employée principalement pour désigner les cas d'utilisation différentielle de deux isomères optiques, et que les phénomènes décrits dans le précédent chapitre ne sont liés à aucune isomérisation. Ensuite, et surtout, parce qu'elle suppose que l'utilisation successive est l'expression d'une « préférence ». Pour autant que ce mot ait un sens, appliqué à des bactéries, il implique l'idée que le sucre « préféré » constitue un aliment plus favorable, c'est-à-dire plus facilement ou plus complètement assimilable. Or il n'en est rien. Nous avons vu que certains sucres *B* ont un rendement de croissance supérieur à certains sucres *A*. Nous avons vu aussi, et cela doit être souligné, que la croissance est plus rapide sur certains sucres *B* que sur certains sucres *A*. Enfin il suffit de jeter un coup d'œil à certaines courbes diauxiques, pour se rendre compte qu'aucune « préférence » ne suffit à expliquer ce phénomène. Nous avons vu que dans bien des cas les deux poussées de croissance sont interrompues par une longue phase de décroissance, au cours de laquelle il semble que la culture, ayant achevé le sucre *A*, se trouve encore incapable pendant assez longtemps, d'utiliser le sucre *B* (Fig. 33, p. 140). D'une manière plus générale il est clair que, dans la diauxie, tout se passe comme si la culture était *incapable d'utiliser simultanément* les deux cons-

tituants de certains couples de glucides : c'est essentiellement cela qu'il s'agit d'expliquer, ce qu'aucune « préférence », même accentuée, ne saurait faire.

Ceci dit, il faut ajouter que l'expression d' « attaque préférentielle » a servi jusqu'ici pour désigner un certain nombre de phénomènes dont le mécanisme réel est inconnu, et parmi lesquels il est fort possible qu'il s'en trouve qui relèvent de la même explication que la diauxie. Et si la nature de ces phénomènes est inconnue, c'est peut-être précisément parce qu'on s'est contenté jusqu'ici de les cataloguer sous l'étiquette : « attaque préférentielle ».

SÉLECTION OU ADAPTATION.

Ainsi, tout se passe comme si, au cours de la première poussée d'une diauxie, la culture possédait et utilisait l'enzyme correspondant au sucre *A*, mais ne possédait pas ou ne formait pas en quantité suffisante l'enzyme correspondant au sucre *B*. La *diauxie paraît être l'expression d'une variation de pouvoir enzymatique*.

Lorsqu'il s'agit d'expliquer une telle variation, deux types d'explication se trouvent toujours en présence : adaptation ou sélection.

1^o *Sélection*. — On sait par de nombreux travaux, en particulier grâce à ceux de MASSINI (1911), de MARCHAL (1932) et de LEWIS (1934) que, dans certains cas, les variations de pouvoir enzymatique doivent être attribuées à de véritables mutations. LEWIS a pu montrer que telle souche de *B. coli*, normalement privée du pouvoir d'attaquer le lactose, pouvait donner naissance par un véritable processus de mutation, à taux faible mais constant, à une souche variante, capable, elle, d'attaquer ce corps. Comme les mutations des êtres supérieurs, celles-ci paraissent dans une très large mesure indépendants des circonstances extérieures, et en particulier de la présence ou de l'absence dans le milieu du corps correspondant à l'enzyme qui apparaît.

On peut sur cette base imaginer un schéma qui rende compte du phénomène de diauxie. Il faudrait admettre qu'une certaine forme α possédant les enzymes capables d'attaquer les sucres *A*, peut donner par mutation, à taux faible, une forme β capable d'attaquer les sucres *B*. Après la croissance de la forme α qui épuise le milieu en sucre *A*, la forme β serait peu à peu sélectionnée, et c'est à elle que serait due la seconde poussée. Ce schéma est possible, quoique

l'ensemble des faits que nous connaissons déjà le rend peu vraisemblable. Il faudrait en effet admettre qu'une transformation due à *une seule mutation* peut entraîner l'apparition de tout l'arsenal enzymatique correspondant aux sucres *B* (1). Si l'apparition de chaque enzyme était due à une mutation distincte, on ne s'expliquerait pas pourquoi on n'observe jamais, quelle que soit la complexité du milieu, plus de deux cycles successifs. Quoi qu'il en soit, ce type d'explication doit être envisagé.

2° *Adaptation*. — On sait depuis fort longtemps que telle souche, incapable d'utiliser un certain corps, peut y être entraînée par des repiquages en série dans un milieu contenant ce corps. S'il est prouvé que dans beaucoup de cas cet « entraînement » est en réalité le résultat de la sélection d'un mutant, il est également démontré que dans d'autres, il s'agit d'une véritable adaptation. Dès 1899 ce problème était posé par DUCLAUX de la façon la plus claire, dans son *Traité de Microbiologie*. DUCLAUX remarquait que si la présence de certains enzymes (chez l'*Aspergillus*, en particulier) ne paraissait pas liée à la présence dans le milieu des corps correspondants, d'autres au contraire n'apparaissent qu'en présence du substrat. Mais il faut attendre jusqu'aux années récentes pour trouver des travaux où cette question soit étudiée systématiquement par des expériences appropriées. On doit à ce sujet citer principalement les travaux de KARSTROM (1932). Cet auteur a montré que l'on pouvait dans l'arsenal enzymatique bactérien, distinguer deux catégories d'enzymes : les uns (enzymes constitutifs) sont toujours présents, quelle que soit la composition des milieux de culture. Les autres n'apparaissent en quantité appréciable que lorsque le milieu contient le substrat approprié (enzymes adaptatifs). On voit que les conclusions de KARSTROM cadrent exactement avec les vues de DUCLAUX. Nous aurons l'occasion au cours du dernier chapitre de revenir plus longuement sur les travaux de KARSTROM et de ses continuateurs. Pour l'instant il nous suffira de constater que ses conclusions pourraient constituer la base d'une explication très plausible des croissances diauxiques : en toutes circonstances les bactéries

(1) Cette hypothèse n'est pas en soi invraisemblable, d'ailleurs. LWOFF et AUDUREAU (1941) viennent de montrer qu'une seule et même mutation conférerait à *Moraxella lwoffii* le pouvoir d'attaquer les acides succinique, *l*-malique et fumarique, auxquels les souches normales ne touchent pas.

posséderaient l'arsenal d'enzymes correspondant aux sucres *A*. Les enzymes des sucres *B* n'apparaîtraient qu'après une adaptation préalable. Il suffit d'imaginer que celle-ci soit suffisamment lente, pour expliquer les deux poussées successives qui caractérisent la diauxie.

INFLUENCE DE L'ORIGINE DE L'INOCULAT SUR LA DIAUXIE.

Reste à savoir si l'une de ces deux hypothèses est la bonne, ou s'il sera nécessaire de recourir à un autre type d'explication. Il est clair que dans l'un comme dans l'autre cas, la diauxie doit être liée aux traitements subis par la souche avant l'essai. Si la souche a été, avant son ensemencement dans un mélange *A. B.*, cultivée en présence du sucre *B*, et que la diauxie soit l'expression d'un phénomène d'adaptation, elle ne pourra se manifester dans ces conditions puisque l'adaptation sera déjà réalisée. Elle ne peut apparaître que si la souche a été antérieurement cultivée sur un milieu *ne contenant pas* le sucre *B* en question. S'il s'agit d'une sélection le résultat sera sans doute le même : cultivée en présence du sucre *B* comme seule source carbonée, la race *B* aura été nécessairement sélectionnée, et il n'y aura pas de diauxie par repiquage dans un milieu *A. B.* (A moins, ce qui n'est pas absolument invraisemblable, que la race *B* ne possède pas le pouvoir d'attaquer le sucre *A*, auquel cas la diauxie pourrait être inversée : il y aurait sélection en sens inverse). Il est donc assez facile d'éprouver à la fois l'hypothèse adaptative et l'hypothèse sélective, et peut être même ces expériences nous permettront-elles de choisir entre ces deux types d'explication. Les expériences qui suivent sont destinées à vérifier ces hypothèses.

1^o *Expériences avec B. subtilis.* — Les expériences consistent dans la comparaison des croissances obtenues sur un mélange *A. B.*, la souche ayant subi auparavant plusieurs passages soit : 1^o sur le sucre *A* ; 2^o sur le sucre *B* ; 3^o sur le mélange *A. B.* Dans toutes les expériences qui suivent, les souches, normalement entretenues sur gélose ordinaire, étaient repiquées sur milieu synthétique *S*, auquel on ajoutait le sucre ou le mélange de sucres approprié. Celui-ci constituait la seule source carbonée. Après un certain nombre de passages en tube à essai, la souche traitée était repiquée dans les fioles d'expériences contenant le mélange *A. B.* Pour les expériences avec *B. subtilis* on a choisi le couple saccharose-dextrine, celui-ci paraîs-

sant donner des diauxies particulièrement accentuées. Les fioles d'expérience contenaient parties égales de saccharose et de dextrine (300 mg. par litre en tout). La figure 53 résume une telle expé-

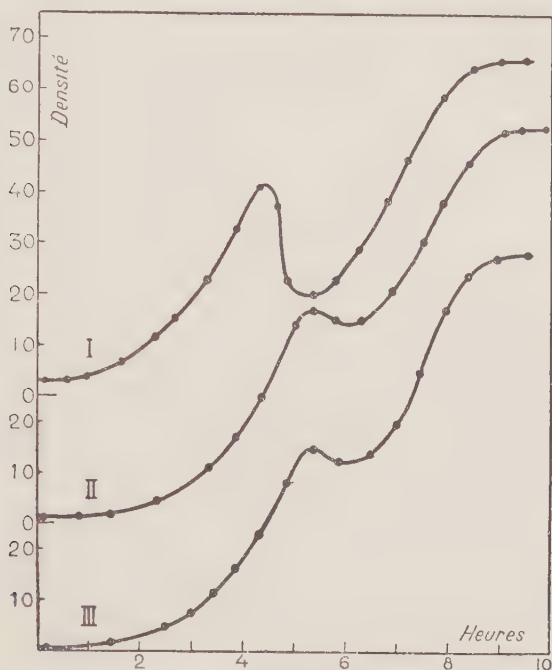


FIG. 53. — Croissance du *B. subtilis* dans un mélange (en proportions égales) saccharose-dextrine : I) après passage sur saccharose ; II) après passage sur dextrine ; III) après passage sur saccharose-dextrine.

rience. Dans le premier cas (courbe I) la souche avait subi quatre passages sur saccharose, ce que l'on peut résumer par le schéma :

$$\text{I)} \quad A^4 \rightarrow A^5.B^1.$$

indiquant que l'expérience correspond au cinquième passage sur *A* et au premier sur *B*. Dans le second cas (courbe II) la souche avait subi quatre passages sur le sucre *B* seul, et dans le dernier, quatre passages sur le mélange *A. B*. On a donc les schémas :

$$\text{II)} \quad B^4 \rightarrow A^1.B^5$$

$$\text{III)} \quad A^4 B^4 \rightarrow A^5.B^5$$

On peut constater que dans tous les cas on obtient une diauxie accentuée. La courbe I diffère cependant des deux autres : la phase de décroissance est plus longue. Il semble donc que la diauxie soit

un peu moins accentuée après culture sur sucre *B* seul ou sur le mélange *A. B*. Mais elle est bien loin de disparaître. L'expérience résumée par la figure 54, semblable aux précédentes, donne des résultats identiques. Elle correspond aux schémas :

- I) $A^3 \rightarrow A^4. B^1.$
 II) $B^3 \rightarrow A^1. B^4.$

la aussi, la diauxie, après passage sur dextrine, est légèrement moins accentuée qu'après passage sur saccharose.

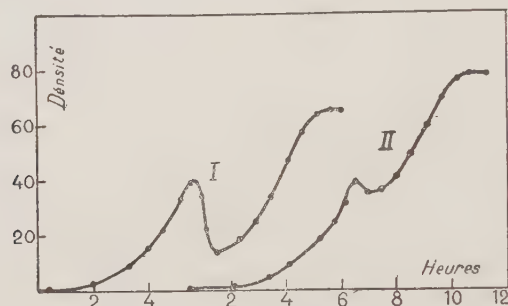


FIG. 54. — Croissance du *B. subtilis* sur un mélange (proportions égales) de saccharose et de dextrine, après passage sur saccharose (I) et sur dextrine (II).

2° *Expériences avec B. coli.* — On obtient avec *B. coli* des résultats essentiellement comparables. La figure 55 concerne la croissance

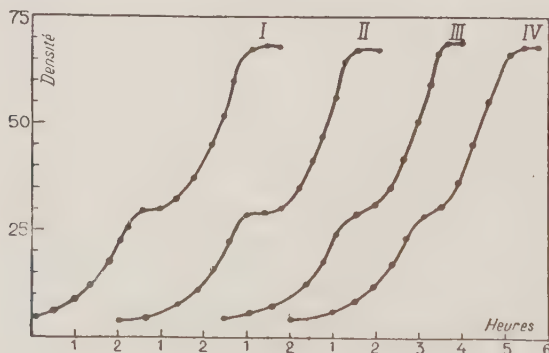


FIG. 55. — Croissance du *B. coli* sur un mélange glucose-maltose (en proportion 1/2), après passage sur glucose (I et II) et sur maltose (III et IV).

de *B. coli* sur le mélange glucose-maltose, après plusieurs passages sur l'un de ces deux sucres ou sur l'autre. Les expériences sont faites

dans des conditions identiques aux précédentes : plusieurs passages en tube avant ensemencement dans les fioles d'expérience. Pour les passages en tube, le milieu contenait 1 pour 1.000 de sucre. Pour les expériences proprement dites, les deux sucres étaient introduits dans le rapport de 1 à 2 (75 mg. par litre de glucose, et 150 mg. par litre de maltose). Les courbes I et II correspondent au schéma :

$$A^4 \rightarrow A^5, B^1.$$

et les courbes III et IV au schéma :

$$B^4 \rightarrow A^1, B^5.$$

On peut voir que ces quatre courbes sont presque identiques les unes aux autres. Après passage sur maltose la diauxie est simplement un peu moins accentuée qu'après passage sur glucose. On peut s'assurer de plus que la fin du premier cycle correspond toujours au tiers environ de la croissance totale. On en conclut que le glucose est bien, dans tous les cas, utilisé le premier : il n'y a *ni suppression ni inversion* de la diauxie. De nombreuses expériences, effectuées avec d'autres couples de sucres, ont prouvé qu'il en est toujours ainsi.

Ces expériences suffisent à éliminer entièrement l'hypothèse d'après laquelle la diauxie représenterait un phénomène de sélection. Il est impossible en effet qu'après plusieurs passages sur sucre *B comme seul aliment carboné* la sélection ne soit pas radicale. Et dans ce cas on devrait obtenir, soit la suppression, soit l'inversion de la diauxie. Il n'en est rien, et cette hypothèse doit être abandonnée.

DIAUXIES PROVOQUÉES AU COURS DE LA CROISSANCE.

Au premier abord ces résultats paraissent éliminer également l'hypothèse de l'adaptation. Avant d'en arriver à cette conclusion, il est nécessaire cependant de procéder à un contrôle supplémentaire. Il n'est pas douteux que dans les expériences précédentes les cultures ayant subi plusieurs passages en présence du sucre *B comme seul aliment carboné* sont bien « adaptées » à ce corps, et possèdent l'enzyme correspondant. Dans ces conditions en effet la diauxie devrait être supprimée lors du repiquage dans le mélange *A. B.*, et on constate qu'elle ne l'est pas. On peut imaginer cependant que cette adaptation est extrêmement fragile et disparaît

lorsque la culture cesse de croître, l'aliment étant épuisé. En faisant cette hypothèse supplémentaire, on pourrait à la rigueur maintenir l'explication purement « adaptative » de la diauxie. Dans les expériences précédentes, en effet, les tubes servant aux ensemencements contenaient des cultures de 12 heures environ, qui avaient cessé de croître. C'est pourquoi un contrôle supplémentaire est nécessaire. Mais pour que l'épreuve soit décisive il ne suffit pas de pratiquer l'ensemencement avec des cultures encore proliférantes : cette précaution ne suffit pas toujours en effet pour supprimer complètement la phase de latence qui, si courte soit-elle, se manifeste généralement dans les cultures en milieux synthétiques, et pendant laquelle on pourrait encore supposer que la perte de l'adaptation soit possible. On est donc amené à pratiquer l'ensemencement dans des fioles d'expériences *ne contenant que le sucre B*, et à *ajouter le*

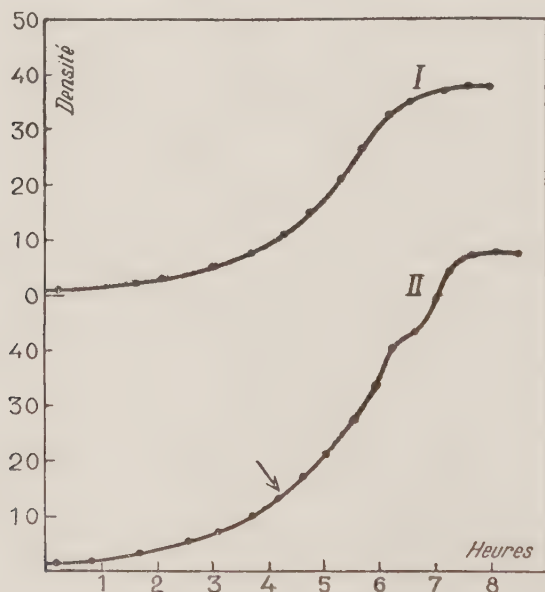


FIG. 56. — Croissance du *B. subtilis* sur dextrine (I) et sur dextrine additionnée de saccharose au moment indiqué par la flèche (II).

sucre A une fois la croissance sur le sucre B commencée. Si cette expérience est positive, elle montrera définitivement que l'adaptation ne suffit pas à expliquer le phénomène de diauxie.

1° *Expériences avec B. subtilis.* — L'expérience est faite dans les mêmes conditions que les précédentes : la souche, entretenue sur

géluse, subit plusieurs repiquages sur milieu synthétique, additionné de dextrine comme seul aliment carboné. Au moment où l'ensemencement est pratiqué, le milieu dans la fiole d'expérience ne contient également que de la dextrine. Une fois la croissance nettement amorcée on aspire aseptiquement par l'effilure de la pipette, une quantité convenable d'une solution de saccharose, stérilisée à part, et contenue dans un petit tube à hémolyse. Tenant compte du nombre de cc. de milieu déjà retiré pour les mesures de densité optique, on peut connaître approximativement la concentration de saccharose ainsi réalisée,

La figure 56 exprime les résultats d'une telle expérience. La souche ensemencée avait subi quatre passages sur milieu S' + dextrine. Le milieu des fioles d'expériences contenait environ 150 mg. par litre de dextrine. Le saccharose a été ajouté 5 heures après l'ensemencement, la concentration réalisée était de 50 mg. par litre environ. La courbe I correspond à la croissance sur dextrine seule. Elle sert de témoin à l'expérience proprement dite, représentée par la courbe II. La flèche indique le moment où le saccharose a été

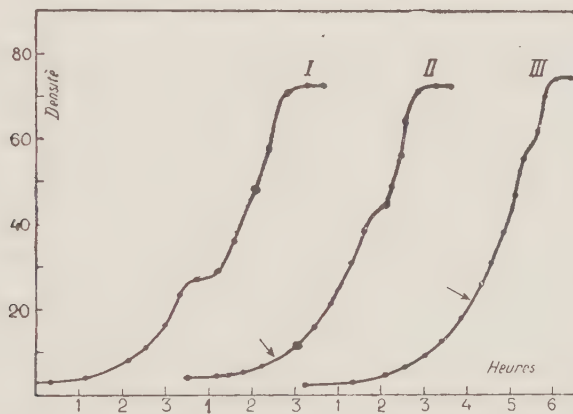


FIG. 57. — Croissance du *B. coli* dans un mélange glucose-sorbité, après passage sur sorbité seule : I) le glucose est ajouté avant l'ensemencement ; II et III) le glucose est ajouté après l'ensemencement, au moment indiqué par la flèche.

introduit dans le milieu. A ce moment la densité de la culture était de 14 environ, elle avait par conséquent déjà accompli plus du quart de sa croissance totale sur dextrine. On voit que la courbe I est normale, alors que dans la courbe II la diauxie se manifeste, sous une forme très atténuée, mais qui ne laisse pas de place au doute.

2° *Expériences avec B. coli.* — L'expérience donne les mêmes résultats avec *B. coli*. La figure 57 résume une expérience concernant le couple glucose-sorbité. La souche avait subi 4 passages préalables sur sorbité seule. Dans le premier cas (courbe I) le glucose a été ajouté avant l'ensemencement. Dans le second lorsque la croissance sur sorbité seule avait déjà commencé. La densité de la culture était alors de 8,5. Dans le troisième la densité déjà atteinte était de 12,5. Dans les trois cas la diauxie est très nette, quoiqu'elle paraisse être d'autant moins accentuée que le glucose est ajouté plus tard.

Il est donc impossible de supprimer complètement la diauxie par une adaptation préalable au sucre *B*. Il semble qu'une souche ayant subi plusieurs passages sur un sucre *B*, comme seul aliment carboné, et en voie de prolifération active aux dépens de ce sucre, cesse de l'utiliser lorsque son milieu est additionné d'un sucre *A*. Elle ne peut l'utiliser à nouveau qu'une fois le sucre *A* épuisé. Du moins est-ce la seule explication possible des faits qui viennent d'être rapportés.

ADAPTATION ET DIAUXIE.

On doit donc admettre que l'hypothèse « adaptative » est à elle seule impuissante à expliquer l'ensemble des faits que nous connaissons maintenant concernant la diauxie. C'est ce que montrent très clairement les expériences précédentes. Mais il faut prendre garde que si ces expériences prouvent que cette hypothèse est insuffisante, elles ne prouvent nullement que le phénomène d'adaptation ne joue pas un rôle dans la diauxie. Au contraire : on constate que l'adaptation modifie très nettement la forme des courbes diauxiques. Le phénomène est visiblement moins accentué lorsque la souche a subi une adaptation préalable, dont elle paraît conserver un « souvenir ». Si l'adaptation au sucre *B* ne paraît pas pouvoir supprimer complètement la diauxie, encore est-il possible que par adaptation on puisse *provoquer* la diauxie dans un mélange ou normalement il ne se produit pas, et cette possibilité doit être contrôlée : nous savons en effet que dans un mélange de deux sucres *B* la diauxie ne se produit pas, tout au moins lorsque l'ensemencement a été pratiqué avec une souche qui n'a pas au préalable subi de passage sur un milieu contenant l'un ou l'autre de ces sucres (expériences relatées au chapitre I). Mais peut-être est-il possible de provoquer un phénomène

de diauxie dans un mélange de sucres *B*, en adaptant au préalable la souche à l'un des deux constituants qui jouerait alors le rôle de sucre *A*.

La figure 58 indique les résultats d'une telle expérience. Elle exprime la croissance de trois cultures de *B. coli* sur un mélange (en proportion 1/2) de maltose et de sorbite. Dans le premier cas

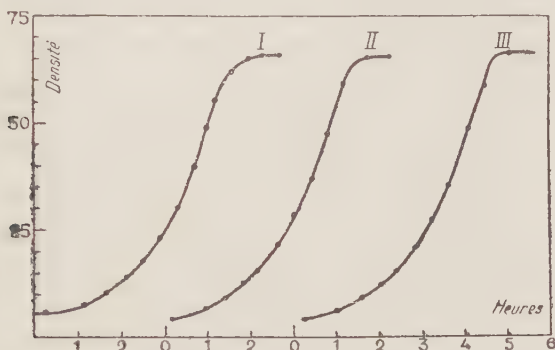


FIG. 58. — Croissance du *B. coli* dans un mélange maltose-sorbité, après passage sur glucose (I), sorbite (II) et maltose (III).

(courbe I) l'ensemencement a été pratiqué avec une souche ayant subi plusieurs repiquages sur sucre *A* (glucose). Cette courbe sert de témoin aux deux autres : dans le second cas, la souche ensemencée avait subi 8 passages préalables sur maltose, dans le dernier 7 passages préalables sur sorbite. Cependant les trois courbes sont identiques et ne manifestent pas trace de diauxie. Celle-ci ne peut donc être *ni supprimée, ni provoquée* par une adaptation préalable.

DOSAGE DES SUCRES AU COURS DES CYCLES DE DIAUXIE.

Toutes les conclusions précédentes ont pour seule base expérimentale la forme des courbes de croissance. Cela est suffisant pour certaines d'entre elles, mais insuffisant pour d'autres. Il importe de les contrôler par des dosages des sucres au cours de la croissance.

Ces dosages ont été effectués par la méthode décrite au chapitre VI de la première partie. La technique employée était identique. Comme il s'agit d'une méthode réductimétrique, elle ne permet pas de doser séparément deux sucres réducteurs. On est donc obligé de ne doser que l'un des deux sucres et de s'arranger pour que l'autre élément du couple étudié soit un polyalcool non réducteur.

Les deux points pour lesquels une confirmation par des dosages directs s'imposent sont les suivants : 1° s'assurer que chaque sucre d'un mélange *A. B.* est *entièrement utilisé* pendant l'un des deux poussées diauxiques ; 2° que dans un mélange *A' A''*, ou *B' B''*, les deux sucres sont effectivement utilisés simultanément, même si la souche a auparavant subi plusieurs passages sur l'un de ces deux sucres.

En d'autres termes, il est nécessaire de s'assurer que la diauxie est un test suffisant de l'assimilation successive.

1° *Dosage du sucre A dans un mélange A. B.* — Pour ce dosage, on utilise le couple glucose-sorbitite. Seul le glucose est dosable par

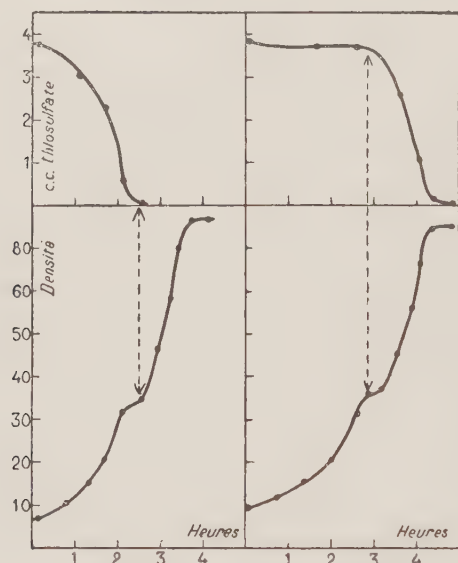


FIG. 59. — *B. coli.* A gauche en bas, croissance sur un mélange *A × B* (glucose-sorbitite), au-dessus, disparition du glucose au cours de la croissance. A droite, croissance sur le mélange mannite-xylose et disparition du xylose au cours de la croissance. Concentrations de sucre exprimées en centimètre cube de thiosulfate.

notre méthode. La souche avait auparavant subi trois passages sur sorbitite. L'expérience correspond donc au schéma :



Le milieu contenait une partie de sucre *A* pour 2 de sucre *B*.

On peut voir (figure 59) qu'au moment où s'achève la première

poussée, le glucose disparaît *entièrement*. Pendant le second, par conséquent, la culture utilise *exclusivement* la sorbite.

2° *Dosage du sucre B dans un mélange A. B.* — On prend pour cette expérience le couple mannite-xylose, où seul le xylose est dosable. L'expérience correspond au schéma :



Le graphique correspondant (fig. 59) met bien en évidence le fait que le xylose, sucre *B*, n'est pas utilisé pendant la première poussée, quoique la culture y ait été adaptée, et qu'il est entièrement utilisé pendant la seconde poussée. On doit observer cependant que tout au début de la croissance, il paraît y avoir une très légère utilisation de xylose. La différence entre le premier et le second dosage, quoique faible, indique probablement que l'adaptation au xylose ne disparaît pas *immédiatement* en présence d'un mélange mannite-xylose. On se trouve à la limite des erreurs possibles, mais cette conclusion, si elle est valable, concorde bien avec les résultats indiquant que la diauxie est moins accentuée après adaptation préalable.

3° *Dosage du sucre B' dans un mélange B' B''.* — On utilise le couple xylose-sorbité, après adaptation à la sorbite par 3 passages successifs. On a le schéma :



La figure 60 montre que dans ce cas, malgré l'adaptation préalable à la sorbite, les deux sucres sont utilisés simultanément. Ceci montre bien que l'on ne peut, par des passages successifs, transformer un sucre *B* en un sucre *A*, et provoquer, comme dans la diauxie, l'assimilation *successive* de deux sucres *B*.

4° *Dosage d'un sucre A' dans un mélange A'A''.* — On a choisi pour cela le couple glucose-mannite, et la culture a été « adaptée » à la mannite par quatre passages successifs :



Le milieu contenait parties égales de glucose et de mannite.

Les résultats sont exprimés par la figure 60. Il est évident que l'utilisation des deux sucres est simultanée. Ici, pas plus que dans l'expérience précédente, l'adaptation préalable ne peut suffire à provoquer le phénomène de diauxie.

Ces différents dosages permettent donc de confirmer et de préciser les résultats fournis par la seule analyse des courbes de croissance :

1° Au cours de chaque cycle de diauxie, la culture utilise *exclusivement* l'un des sucres constituant le mélange.

2° Dans la diauxie, le sucre *A* est toujours utilisé le premier.

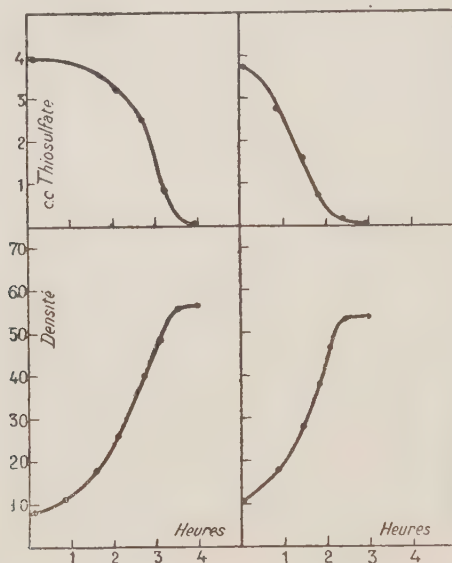


FIG. 60. — A gauche, en bas, croissance du *B. coli* dans un mélange de deux sucres B (xylose-sorbitite) ; au-dessus, évolution du xylose au cours de la croissance. A droite, croissance sur deux sucres A (glucose-mannite) et évolution du glucose au cours de la croissance. Concentrations de sucre exprimées en centimètre cube de thiosulfate.

3° L'adaptation préalable au sucre *B* ne peut supprimer la diauxie.

4° Dans les mélanges de deux sucres *A* ou de deux sucres *B* les deux constituants sont toujours utilisés simultanément, même lorsque la souche a, auparavant, subi plusieurs passages sur l'un des constituants du mélange. L'adaptation ne peut ni supprimer, ni provoquer la diauxie.

Résumé du chapitre II.

Les dosages des sucres au cours de la croissance, aussi bien que la comparaison de la forme des courbes diauxiques obtenues en présence de proportions différentes d'un mélange de sucres *A* et *B*

montre que la diauxie est liée à l'utilisation successive de ces sucres. Le sucre *A* est toujours *entièrement utilisé* pendant le premier cycle, le sucre *B* pendant le second. *En conséquence tout se passe comme si, en présence du sucre A, la culture était incapable d'utiliser le sucre B.* Dans beaucoup de cas elle n'en devient, semble-t-il, capable que quelque temps *après* que le sucre *A* a *complètement disparu*. L'hypothèse d'une « attaque préférentielle » est impuissante à rendre compte de ces faits : elle n'a aucune valeur explicative et ne donne même pas une idée correcte du phénomène.

On doit admettre que la diauxie est l'expression d'une variation de pouvoir enzymatique au cours de la croissance. On se trouve en présence de deux explications possibles : adaptation ou sélection. L'expérience montre cependant que l'hypothèse d'une sélection est insoutenable, et que celle de l'adaptation est en tous cas insuffisante : en effet on ne peut ni *supprimer* ni *inverser* la diauxie dans un mélange *A. B.* par culture préalable de la souche en présence du sucre *B* comme seul aliment carboné. Il est également impossible de provoquer la diauxie dans un mélange de deux sucres *B* par entraînement préalable à l'un de ces deux sucres.

Il semble cependant que l'adaptation joue un certain rôle dans le phénomène. Si elle ne peut supprimer la diauxie dans un mélange *A. B.* elle peut au moins l'atténuer.



CHAPITRE III

Le mécanisme de la diauxie.

Les résultats consignés dans le chapitre précédent nous ont montré que :

1° La diauxie est l'expression d'une variation de pouvoir enzymatique au cours de la croissance.

2° La diauxie est étrangère à tout phénomène de sélection.

3° L'hypothèse d'une adaptation est impuissante à expliquer tous les faits.

Avant d'envisager d'autres hypothèses capables de rendre compte du mécanisme de la diauxie, il convient cependant de revenir sur la question de l'adaptation. L'hypothèse que nous avons considérée comme plausible au début du précédent chapitre, était la suivante : les souches bactériennes possèdent normalement les enzymes correspondant aux sucres *A*, alors que les enzymes correspondant aux sucres *B* n'apparaîtraient qu'en présence du substrat. L'expérience montre que cette explication est insuffisante, puisque l'adaptation préalable ne fait pas disparaître la diauxie, mais elle ne prouve pas que ses prémisses soient fausses. Il semble acquis que l'adaptation joue un certain rôle dans la diauxie.

ENZYMES CONSTITUTIFS ET ENZYMES ADAPTATIFS.

La distinction systématique entre « enzymes constitutifs » et « enzymes adaptatifs » est due à KARSTROM (1930). Elle est basée sur le type d'expérience suivant : Une souche bactérienne ayant poussé sur un milieu dépourvu d'un certain sucre est, après centrifugation, mise en présence de ce sucre, mais en l'absence d'une source d'azote, de façon à interdire toute prolifération. Dans ces conditions on

constate que certains sucres sont immédiatement attaqués. D'autres au contraire ne le sont pas du tout : l'attaque ne se produit que quelque temps après l'addition au milieu d'une source d'azote, permettant à la culture de reprendre sa croissance. Dans le premier cas l'enzyme paraît être un constituant constant de la cellule. Dans le second, il n'apparaît que lorsque la culture a été en mesure de croître, même faiblement, en présence du substrat. Quoique l'apparition de l'enzyme ne se produise en général que lorsqu'il y a eu *croissance en présence du substrat*, il est certain qu'il s'agit bien d'une véritable adaptation et non d'un phénomène de sélection. Celle-ci en effet est toujours beaucoup plus lente, ou plus exactement ne peut se produire qu'à la faveur d'un accroissement beaucoup plus considérable. Dans quelques cas d'ailleurs, il est prouvé que l'adaptation peut se produire sans aucun accroissement du nombre de cellules (Galactozymase chez *S. cerevisiae* d'après DIENERT, 1900, confirmé par STEPHENSON et YUDKIN, 1936 ; hydrogenelyase de l'acide formique, chez *B. coli*, d'après STEPHENSON et STICKLAND, 1933).

L'adaptation ne se produit pas dans des cultures rendues stériles par agitation avec du chloroforme ou du toluène. Quoique l'adaptation soit en règle générale associée avec la croissance, on doit, semble-t-il, admettre qu'il s'agit bien *uniquement* d'une réponse à un stimulus chimique (STEPHENSON, 1939).

La distinction entre enzymes constitutifs et adaptatifs aboutit à un classement des sucres correspondants, classement dont l'analogie avec celui que permet d'établir le phénomène de diauxie est tout à fait frappant et ne saurait être attribué au hasard : le tableau suivant en donnera un exemple. Il se rapporte aux fermentations provoquées par « *Betacoccus arabinosaceus* ». La colonne de gauche indique le sucre en présence duquel la souche a été cultivée. Dans les colonnes de droite, le signe + indique que le sucre correspondant est immédiatement fermentescible, le signe 0, qu'il ne l'est qu'après « induction ». Le signe — indique l'absence de données.

TABLEAU XXXII.
Fermentations de Betacoccus arabinosaceus
(d'après KARSTROM, 1930).

Souche cultivée en présence de	Sucres ultérieurement fermentés						
	Glucose	Fructose	Mannose	Galactose	Arabinose	Saccharose	Lactose
Glucose 2 %	+	+	+	0	0	0	0
Saccharose 2 %	+	+	—	0	0	+	0
Maltose 2 %	+	+	—	0	0	+	0
Lactose 1 %	+	+	—	+	0	+	+
Galactose 0,8 %	+	+	—	+	0	+	0
Arabinose 0,8 %	+	+	+	—	+	—	—
Milieu sans glucides	+	+	+	—	—	+	—

L'examen de ce tableau montre qu'un certain nombre de sucres sont immédiatement attaqués dans tous les cas, tandis que d'autres ne le sont que quand la souche a été cultivée en leur présence. Si l'on réunit dans une liste *A* les premiers dans une liste *B* les seconds, on trouve :

A	B
Glucose	Arabinose
Mannose	Galactose
Fructose	Maltose
Saccharose	Lactose

Différentes souches de *B. coli* donnent des résultats tout à fait analogues. On doit signaler cependant que pour certaines d'entre elles le saccharose correspond à un enzyme adaptatif, le maltose à un enzyme constitutif.

Quoi qu'il en soit il existe entre cette classification et celle que permet d'établir le phénomène de diauxie une corrélation évidente : les sucres *A* paraissent correspondre à des enzymes constitutifs, les sucres *B* à des enzymes adaptatifs.

TEMPS DE LATENCE SUR SUCRES *A* ET SUR SUCRES *B*.

Par conséquent l'hypothèse « adaptative », si elle est insuffisante, n'est pas inexacte, et elle doit entrer en ligne de compte. Il est

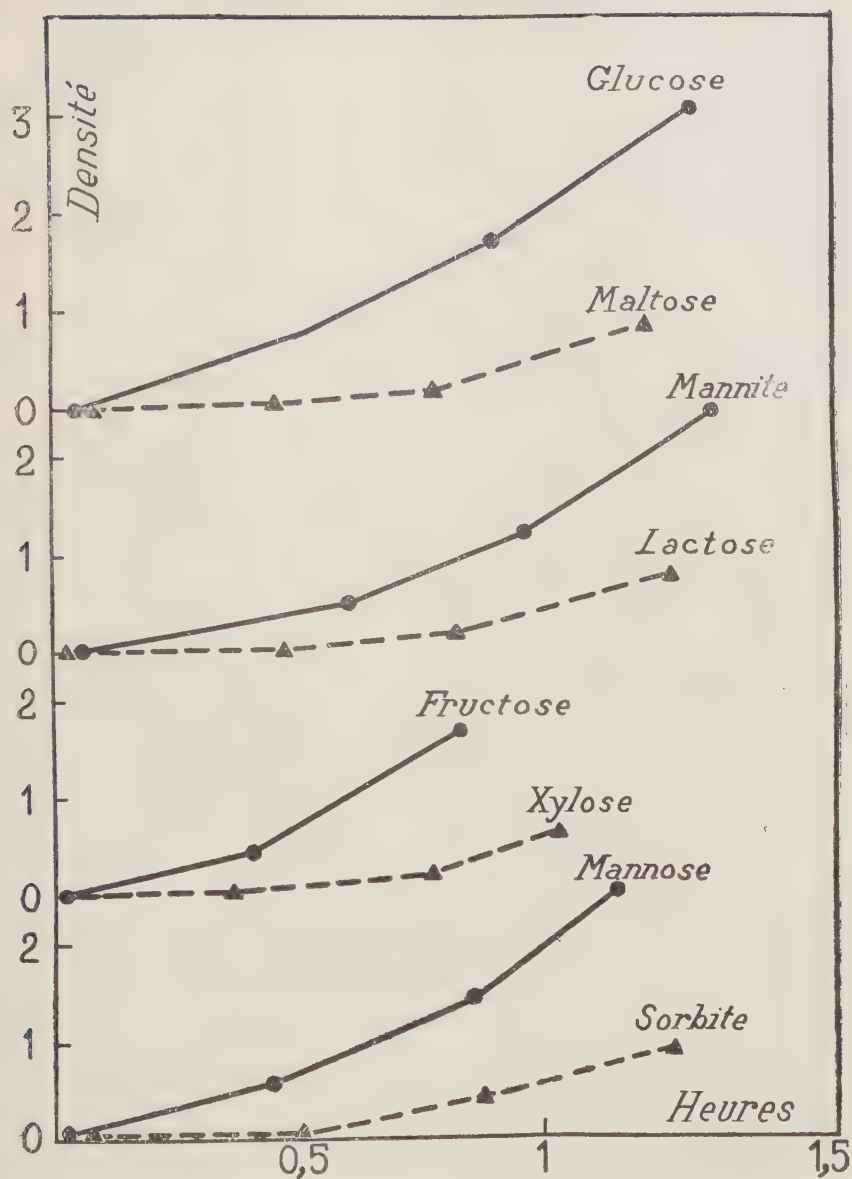


FIG. 61. — Accroissements provoqués par l'addition de différents sucres A (traits pleins) ou B (traits interrompus), dans des cultures ayant auparavant achevé leur croissance dans un milieu dépourvu de sucre.

nécessaire cependant de vérifier que les « temps d'induction » des enzymes adaptatifs, mis en évidence par KARSTROM, peuvent effectivement se manifester dans les courbes de croissance. Il est vraisemblable qu'ils doivent se révéler sous la forme d'une phase de latence plus prolongée lorsque les bactéries sont repiquées dans un milieu ne contenant comme source carbonée qu'un sucre *B* auxquelles elles ne sont pas adaptées. Cette phase doit être beaucoup plus courte, ou insensible, avec les sucres *A*, dans les mêmes conditions.

Les expériences qui suivent permettront de se rendre compte qu'il en est bien ainsi, et confirment en même temps que les sucres *A* correspondent à des enzymes constitutifs, les sucres *B* à des enzymes adaptatifs.

Les bactéries (*B. coli*) entretenues avant l'expérience sur milieu *S* + lactate de soude, à 0,2 p. 1.000, sont ensemencées dans des fioles d'expérience contenant le même milieu. La croissance dans ces fioles est suivie par les habituelles mesures de densité optique. Lorsque la croissance est arrivée à son terme, on sait que le milieu ne contient plus de lactate. Une heure environ après que le maximum a été atteint, on ensemence à l'aide de cette culture des fioles neuves contenant du milieu synthétique, additionné du sucre à essayer (75 mg. par litre). La croissance dans ces fioles est suivie pendant une heure environ. La figure 61 exprime les résultats obtenus avec huit sucres, comprenant 4 sucres *A* (glucose, mannose, fructose, mannite) et 4 sucres *B* (xylose, sorbite, maltose, lactose). Chaque graphique permet de comparer le début de la croissance sur un sucre *A* et un sucre *B*. On peut voir que dans tous les cas, la croissance sur les sucres *A* commence immédiatement. Il n'y a pas de latence sensible. Dans le cas des sucres *B*, la croissance ne débute qu'après un certain temps (1/2 heure au moins).

Par conséquent des bactéries ayant au préalable été cultivées sur un milieu ne contenant pas de sucre, sont capables d'utiliser immédiatement les sucres *A*. En revanche, elles ne peuvent croître aux dépens des sucres *B* qu'après un « temps d'induction » de 1/2 heure à une heure.

Ces résultats se superposent exactement à ceux de KARSTROM et il ne peut faire de doute que cette phase de latence sur les sucres *B* représente le temps nécessaire pour que l'enzyme soit produit en quantité suffisante.

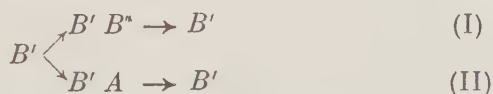
DIAUXIE ET INHIBITION DE L'ADAPTATION.

Il apparaît donc de plus en plus clairement que la diauxie est liée à un phénomène d'adaptation. Mais il reste alors à expliquer le fait essentiel : que la diauxie ne peut être supprimée par aucune adaptation préalable et qu'elle se produit même lorsqu'un sucre *A* est ajouté dans une culture déjà en voie de prolifération active aux dépens d'un sucre *B*.

Il est à peu près évident maintenant que ce fait ne peut s'expliquer que par une *action inhibitrice des sucres A* (ou du moins, en ce qui concerne *B. coli*, de certains d'entre eux. On se rappelle que, chez cette dernière espèce, la diauxie ne se manifeste qu'en présence de mannite ou de glucose). Comme nous savons d'autre part que les sucres *B* ne sont utilisables qu'après adaptation il paraît plus que vraisemblable que l'action des sucres *A* consiste précisément dans l'inhibition de cette adaptation, ou dans sa suppression lorsqu'elle est déjà acquise. Cette interprétation est en accord avec tous les faits énumérés au cours des précédents chapitres. Seule elle peut expliquer à la fois les corrélations évidentes entre sucres *B* et enzymes adaptatifs et le fait que la diauxie ne puisse être supprimée par adaptation préalable. L'expérience suivante cependant mettra particulièrement en évidence l'action inhibitrice des sucres *A*.

Le principe de l'expérience est le suivant : une souche de *B. coli* est adaptée à un sucre *B* par des passages répétés sur un milieu contenant ce sucre comme seul aliment carboné. Elle est alorsensemencée dans des fioles d'expérience contenant : 1° un mélange de ce sucre et d'un autre sucre *B* ; 2° un mélange de ce sucre et d'un sucre *A* tel que le glucose ou la mannite.

La croissance dans ces fioles est suivie par des mesures de densité. Au bout de deux ou trois heures environ, et en tous cas *avant que la culture sur mélange A. B. ne soit parvenue à la fin du premier cycle de croissance*, les deux cultures sont ensemencées après centrifugation et lavage dans un milieu ne contenant que le sucre auquel la souche avait été entraînée au préalable. Cette expérience peut se résumer par le schéma :



Dans l'un et l'autre cas la souche a été adaptée au sucre B' et reste constamment en présence de ce sucre, mais dans le premier la souche adaptée a été mise en présence d'un autre sucre B , dans le second d'un sucre A . Si la présence du sucre A fait disparaître l'inhibition, la seconde culture, au moment de son réensemencement dans le sucre B' seul, doit se comporter comme si elle n'avait pas été adaptée. La première au contraire aura conservé son adaptation.

La figure 62 permettra de se rendre compte que ces prévisions sont exactement réalisées. La souche avait été adaptée au sucre B'

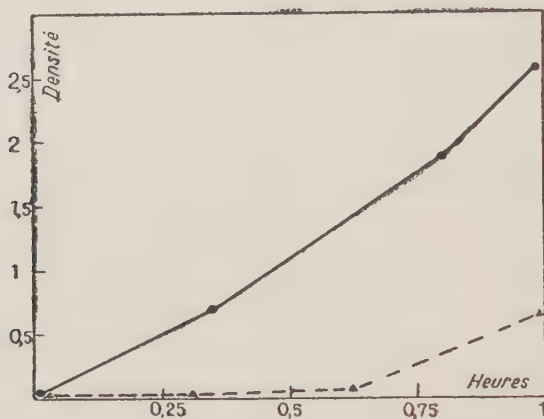


FIG. 62. — *B. coli*, souche « adaptée » au xylose : début de la croissance après passage sur un mélange sorbite-xylose (trait plein) et après passage sur un mélange glucose-xylose (trait interrompu).

le xylose, par trois passages successifs. Le sucre A était du glucose, l'autre sucre B , de la sorbite.

Le milieu des fioles d'expérience pour le passage dans le mélange contenait 150 mg. par litre de chaque sucre. Les cultures y furent prélevées et centrifugées lorsqu'elles eurent atteint la densité 30 (la densité correspondant à la fin du premier cycle étant de 40 environ). Après deux centrifugations et lavage dans le milieu dépourvu de sucre, des quantités équivalentes furent ensemencées dans des fioles d'expériences contenant du xylose (75 mg. par litre). On peut constater qu'après le passage sur sorbite-xylose, la culture n'a pas perdu son adaptation, mais que celle-ci a disparu après passage sur glucose-xylose : la croissance ne reprend qu'après un temps de latence très net.

Répétée dans les mêmes conditions avec d'autres sucres, cette

expérience a donné des résultats identiques. Son interprétation ne peut faire de doute : en présence des sucres *A* (de certains d'entre eux seulement dans le cas de *B. coli*), l'adaptation aux sucres *B* est inhibée. Elle est supprimée dans le cas où elle est déjà acquise.

ESSAI D'INHIBITION PAR UN SUCRE *A* NON ATTAQUÉ.

Dans ces conditions, on doit se demander aussitôt si il ne serait pas possible de provoquer la même inhibition avec un sucre *A* qui ne serait pas lui-même attaquant par la souche expérimentée. Malheureusement, cette expérience est difficilement réalisable car les sucres *A* sont tous attaquant par l'immense majorité des espèces bactériennes. Seul le saccharose, qui joue le rôle de sucre *A* chez *B. subtilis*, n'est pas dans ce cas. Il n'était pas attaquant par la souche de *B. coli* que j'utilisais. L'expérience a donc été faite, en comparant la croissance de *B. coli* dans un mélange glucose-

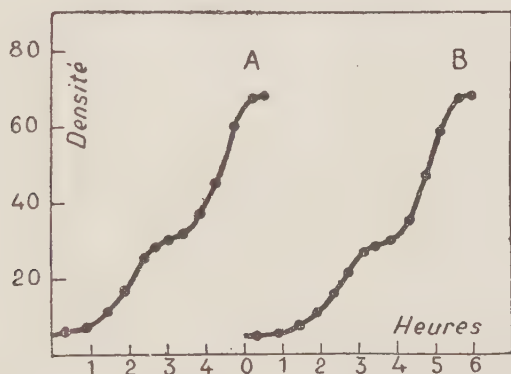


FIG. 63. — Croissance du *B. coli* sur un mélange glucose-maltose (A) et sur le même mélange additionné de saccharose (B).

maltose, d'une part, et dans le même mélange additionné de saccharose, d'autre part. Si le saccharose exerçait une action sur l'adaptation au sucre *B* (le maltose), le second cycle de la courbe de croissance devrait être supprimé, ou au moins modifié. L'expérience montre qu'il n'en est rien, et que les deux courbes sont identiques (fig. 63). Le saccharose ajouté ne joue aucun rôle. On ne saurait cependant baser une conclusion définitive sur un seul résultat négatif. Cette expérience devra être reprise avec d'autres sucres *A*. Mais elle exigera une étude préalable de la diauxie dans des souches

incapables d'utiliser certains sucres *A* et de telles souches sont assez exceptionnelles.

INTERPRÉTATION DE LA PHASE D'ARRÊT DE LA CROISSANCE.

Ainsi nous sommes amenés à considérer les courbes diauxiques comme résultant de deux phénomènes : adaptation et inhibition. La signification de la phase d'arrêt ou de ralentissement de la croissance qui caractérise les courbes diauxiques devient alors tout à fait claire : elle représente le temps nécessaire à l'adaptation ou à la réadaptation de la souche au sucre *B*. On doit se demander de quels facteurs dépend la durée de cette phase d'arrêt. L'examen des graphiques exprimant les résultats utilisés au chapitre I semble indiquer que, d'une manière générale, la durée de la phase d'arrêt dépend plus du sucre *B* que du sucre *A*. Extrêmement longue avec certains sucres *B* (*B. coli* sur dulcité-glucose), elle est beaucoup moins marquée avec d'autres (*B. coli* sur glucose-galactose). Ces

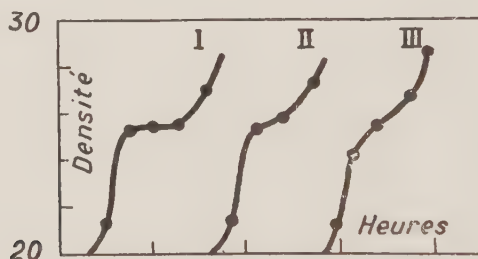


FIG. 64. — Phase de ralentissement d'une croissance diauxique de *B. coli* en présence de concentrations croissantes du sucre *B*.

résultats expriment évidemment le fait que certains enzymes sont beaucoup plus facilement adaptables que d'autres, et que certains mêmes ne doivent jamais disparaître complètement. Ce doit être en particulier le cas pour le galactose. Cette conclusion est précisément en accord avec des résultats de STEPHENSON et GALE (1937). Ces auteurs ont montré que la galactozymase de *B. coli*, quoique devant être considérée comme adaptative, ne disparaît jamais complètement, même en l'absence de son substrat.

D'autre part nous savons, d'après un certain nombre d'expériences rapportées au chapitre précédent, que l'adaptation précé-

lable au sucre *B* atténue la diauxie dans un mélange *A. B.* donné. Tout « souvenir » de cette adaptation préalable ne disparaît donc pas complètement en présence du sucre *A*. Cela paraît assez naturel, sans qu'il soit possible d'en donner une interprétation précise.

On peut se demander si l'adaptation est plus rapide en présence de fortes concentrations de sucre *B*. La figure 64 montrera qu'il en est bien ainsi, mais que cet effet n'est pas extrêmement marqué. Il représente la phase d'arrêt de trois cultures de *B. coli* sur le mélange glucose-sorbité. Le milieu contenait 75 mg. par litre de glucose dans les trois cas, et des concentrations croissantes de sorbité : 50, 150 et 500 mg. par litre. Les différences relevées entre les trois courbes indiquent que la rapidité de l'adaptation dépend dans une certaine mesure de la concentration du sucre *B*.

Discussion.

L'ensemble des résultats qui viennent d'être exposés indiquent que la diauxie est l'expression d'une variation de pouvoir enzymatique, que cette variation est liée à la nature adaptative de certains enzymes et au pouvoir que semblent posséder certains sucres d'inhiber ces enzymes, ou plus exactement d'inhiber leur adaptation. Quelle est la nature de cette inhibition, son mécanisme précis, tel est le problème que pose en définitive le phénomène de diauxie.

Il a été signalé, on le sait, de très nombreux cas d'inhibition d'enzymes bactériens, par des corps variés. Mais il semble qu'une distinction essentielle doive être faite entre les cas d'inhibition proprement dite et le cas qui nous occupe, où il s'agit plus précisément d'une *suppression* d'enzyme. Dans le premier cas, c'est l'*activité* de l'enzyme qui ne peut se manifester, dans le second il semble que ce soit la *production* de l'enzyme qui soit interrompue.

Les cas d'inhibition proprement dite, par des substances spécifiques, sont assez nombreux, et ont donné lieu à des recherches systématiques (QUASTEL et al.). En revanche il semble que l'on ne connaisse jusqu'ici que des cas isolés de suppression d'enzyme. La première observation de ce phénomène paraît devoir être attribuée à DIENERT (1900). Il montra que la levure, entraînée à l'utilisation du galactose, perdait en partie son adaptation en présence de glucose. La même observation a été, par la suite, renouvelée par un

certain nombre d'auteurs (EULER et LOVGREN, 1925 ; SOHNGREN et COOLHAAS, 1924). STEPHENSON et YUDKIN (1936) ont étudié ce cas avec précision. Une suspension de levure est adaptée au galactose par contact avec ce sucre. Le cours de l'adaptation est suivi par la détermination de l'activité de la galactozymase. Après deux jours de contact, une partie des levures adaptées est lavée et remise en suspension dans une solution de galactose, une autre dans une solution de glucose, une troisième dans de l'eau. La détermination de l'activité de la galactozymase dans ces trois cas montre que dans le premier (en présence de galactose) l'activité augmente à nouveau, que dans le second (glucose) elle tombe rapidement, et que dans le

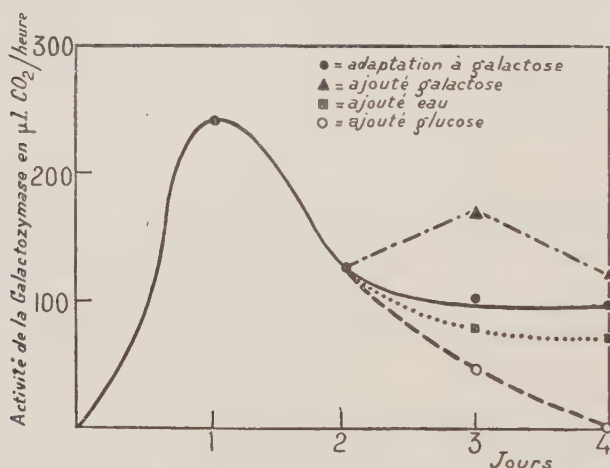


FIG. 65. — Effet inhibiteur du glucose sur l'adaptation au galactose de *Saccharomyces cerevisiae* (D'après Stephenson et Yudkin, 1936).

dernier (eau) elle demeure constante (fig. 65). STEPHENSON et GALE (1937) étudiant les conditions qui influent sur la production de la galactozymase de *B. coli*, ont montré que l'activité de cet enzyme, si elle est de 510 dans du bouillon contenant du galactose, n'est plus que de 70 si le bouillon contient en outre du glucose. DIENERT (*loc. cit.*) avait montré en outre que l'adaptation de la levure au galactose ne se produit pas en présence fructose. Il avait vu de plus que certaines substances (acide borique Toluène) imbibent l'adaptation sans empêcher la fermentation de glucose. Ces observations sont donc absolument en accord avec les conclusions auxquelles on est conduit par l'étude de la diauxie : en présence de certains sucres, l'adaptation des souches à certains autres est diminuée

ou supprimée. D'après une observation de STARK, SHERMAN et STARK (1928) il semble que l'activité suppressive du glucose puisse ne pas être limitée aux enzymes attaquant des corps voisins. Ces auteurs ont montré que la formation des enzymes responsables de la production de la toxine botulique est inhibée dans les milieux contenant du glucose (1).

* * *

Les faits mis en lumière par l'étude de la diauxie montrent que la suppression d'enzymes en présence de certains substrats est un phénomène général, extrêmement fréquent, et qu'il est la règle pour toute une catégorie d'enzymes. Il apparaît que la distinction empirique entre sucres *A* et *B* correspond à une différence entre les propriétés des enzymes qui attaquent ces sucres. Les uns sont adaptatifs et *supprimables*, les autres sont constitutifs et *non supprimables*. Une autre distinction doit alors être faite entre les sucres, suivant qu'ils sont capables ou non de provoquer cette suppression. Nous avons vu en effet, que si chez *B. subtilis*, tous les sucres *A* peuvent provoquer la diauxie, chez *B. coli* certains d'entre eux seulement sont doués de cette propriété. On doit donc distinguer entre des sucres *inhibiteurs* et des sucres *non inhibiteurs*. Les premiers paraissent toujours être des sucres *A*, les seconds comprennent à la fois des sucres *A* et des sucres *B*. Pour expliquer le phénomène de la diauxie, il faut rendre compte aussi bien du mécanisme de l'adaptation que de celui de la suppression. Toute théorie sur la formation des enzymes bactériens devra tenir compte de ces faits en particulier de la propriété inhibitrice dévolue à certains substrats.

Si l'étude de la diauxie permet de définir ce problème et de montrer son importance, elle ne permet pas encore d'entrevoir une

(1) Peut-être certains faits mis en lumière par JOHNSON (1936, 1937, 1938), doivent-ils être rapprochés de ceux qui nous occupent. Cet auteur a montré que chez les bactéries lumineuses, l'oxydation de certains glucides était inhibée en présence de corps voisins, *qui n'étaient pas eux-mêmes attaquables*. Mais il semble, d'après les expériences de JOHNSON, qu'il s'agisse ici d'un cas d'inhibition proprement dit, et non pas d'une suppression d'enzyme. De plus il semble que les mêmes corps puissent jouer tantôt un rôle inhibiteur, tantôt un rôle stimulant, observation qui n'a pas de parallèle dans le cas de la diauxie.

solution précise. Cependant, on peut se demander dans quelle voie celle-ci peut être cherchée.

L'adaptation et la différence apparente entre enzymes constitutifs et enzymes adaptatifs a déjà donné lieu à quelques discussions et à quelques suggestions. D'après QUASTEL (1937), cette distinction ne correspondrait pas à une différence essentielle dans le mécanisme de la formation de ces deux catégories d'enzymes. Il ne s'agirait que d'une différence quantitative, les deux classes représenteraient simplement : « les limites de variabilité des enzymes dans la cellule ». Si vraisemblable que soit cette conception, on doit noter que les faits concernant la diauxie indiquent l'existence d'une autre différence entre enzymes constitutifs et enzymes adaptatifs : les uns sont « non supprimables » et les autres « supprimables ». Peut-être serait-il plus difficile d'expliquer ce fait sur la base de simples différences quantitatives. Dernièrement YUDKIN (1938) a proposé de considérer la formation des enzymes comme résultant d'une réaction d'équilibre :



En présence d'un substrat se combinant avec l'enzyme l'équilibre serait rompu, et il en résulterait une formation accrue d'enzyme. Tel serait le mécanisme de l'adaptation. La distinction entre enzymes adaptatifs et constitutifs tiendrait à la valeur de la constante d'équilibre de la réaction précurseur-enzyme. Ce schéma est séduisant, mais encore trop vague pour être susceptible de vérification bien précise.

Peut-être cependant un tel schéma pourrait-il rendre compte du mécanisme de la suppression : il faudrait admettre qu'un précurseur commun peut donner naissance à plusieurs enzymes, avec des constantes d'équilibre différentes pour chaque réaction. On s'expliquerait alors qu'en présence de certains substrats le précurseur soit entièrement « accaparé ». C'est là une hypothèse possible sinon vraisemblable. Une suggestion récemment apportée par KOCHOLATY et WEILL (1938) pourrait également fournir la base d'une explication possible : le nombre des transporteurs colloïdaux dans la cellule serait limité et inférieur à celui des enzymes. On concevrait alors qu'ils puissent être échangés suivant les possibilités du moment, et la « demande du substrat ».

Ces divers types d'explication ne sont mentionnés ici qu'à titre

d'indication ; d'autres pourraient être envisagés avec autant de vraisemblance. Avant de pouvoir choisir entre eux il sera nécessaire de réunir encore beaucoup de matériaux expérimentaux concernant les phénomènes dont la diauxie est le témoin.

Résumé du chapitre III.

Le classement des sucres en deux catégories correspond précisément au classement des enzymes constitutifs et adaptatifs. Cela est démontré par la comparaison des résultats de ce travail avec ceux de KARSTROM, ainsi que par des expériences directes. Ces expériences indiquent en outre que ces différences entre enzymes se manifestent effectivement dans les courbes de croissance. Dans ces conditions il paraît certain que le phénomène exprimé par les courbes diauxiques est une inhibition ou plutôt une suppression d'enzymes : en présence de certains sucres (sucres inhibiteurs) l'adaptation aux sucres *B* est inhibée.

L'existence d'un tel phénomène a déjà été signalée par quelques auteurs dont les conclusions sont en accord avec celles auxquelles conduisent l'étude de la diauxie.



RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DE LA SECONDE PARTIE

Lorsque l'on étudie la croissance de souches bactériennes variées en présence de différents mélanges d'hydrates de carbone, on constate que, dans certains mélanges, la croissance est anormale : elle est momentanément interrompue par une phase de ralentissement ou même de décroissance accentuée.

D'expériences très nombreuses il ressort que ce phénomène, désigné sous le nom de « diauxie », est lié à la présence dans le milieu de culture de certains couples d'hydrates de carbone. On est ainsi conduit à classer les sucres utilisables par chaque souche bactérienne en deux catégories : on a appelé sucres *A* ceux qui, associés au glucose, ne donnent pas lieu à ce phénomène, sucres *B* ceux qui, dans les mêmes conditions, le provoquent. Quel que soit le nombre d'hydrates de carbone en présence dans le milieu, on n'observe jamais plus de deux cycles successifs de croissance. Le phénomène de diauxie est extrêmement répandu : des espèces bactériennes très différentes le manifestent dans des conditions semblables : les mêmes corps se retrouvent dans les catégories *A* et *B*.

La croissance totale correspondant à la première partie d'une diauxie est toujours proportionnelle à la concentration du sucre *A*, la croissance totale pendant la seconde partie, proportionnelle à la concentration du sucre *B*. On peut en conclure, et des dosages directs confirment cette conclusion, que le sucre *A* est toujours *entièrement assimilé* avant que le sucre *B* soit lui-même attaqué. Tout se passe comme si, pendant le premier cycle, la culture était incapable d'utiliser le sucre *B*. Dans bien des cas cette incapacité se manifeste pendant un certain temps encore *après la disparition du sucre A*. Ce phénomène ne peut donc être assimilé à une « attaque préférentielle ». Il exprime évidemment une variation de pouvoir enzymatique au cours de la croissance.

Cette variation ne peut s'expliquer par la sélection progressive d'un variant apparu par mutation : en effet, la culture préalable de la souche sur un milieu contenant un sucre *B* comme seul aliment carboné ne peut ni supprimer ni inverser la diauxie qui se produit toujours, même lorsque le sucre *A* est ajouté dans une culture en voie de prolifération active aux dépens du sucre *B*. Ces expériences prouvent également que la diauxie ne peut pas non plus s'expliquer entièrement par un phénomène d'adaptation.

Toutefois de nombreuses observations indiquent que l'adaptation joue un certain rôle dans la diauxie. Il apparaît en outre, qu'aux sucres *A* correspondent des enzymes constitutifs, aux sucres *B* des enzymes adaptatifs, au sens de KARSTROM. Dans ces conditions, il semble que la seule explication possible soit qu'en présence de certains sucres l'adaptation est inhibée, ou supprimée lorsqu'elle est déjà acquise. La diauxie se ramène donc à un phénomène de suppression d'enzyme, suppression qui ne joue qu'aux dépens des enzymes adaptatifs et qui est provoquée par certains substrats, correspondant à des enzymes constitutifs.

Quelques cas de suppression d'enzyme ont été signalés, mais le mécanisme de ce phénomène est inconnu. Les faits généraux révélés par l'étude de la diauxie démontrent son importance dans la physiologie bactérienne et permettent de préciser le problème. Cependant il n'est pas possible encore d'en proposer un schéma explicatif précis. Toute théorie sur le mécanisme de la formation des enzymes chez les microorganismes devra tenir compte de ces faits et être capable d'en rendre compte.



BIBLIOGRAPHIE

- ALLEE W. C. — 1927. Animal aggregations. *Quart. Rev. Biology*, **2**, p. 369-398.
— 1934. Recent studies in mass physiology. *Biol. rev.*, **9**, p. 1.
- AMBERSON W. R. — 1928. The influence of oxygen tension upon the respiration of unicellular organisms. *Biol. Bull.*, **55**, p. 79.
- ARMSTRONG. — 1912. Simple carbohydrates and Glucosides.
- BAIL O. — 1929. Bakterienkultur als Hilfsmittel experimenteller Populationsforschung. *Arch. f. Hygiene*, **102**, p. 71.
- BARBER. — 1908. The rate of multiplication of *B. coli* at different temperatures. *J. Inf. Diseases*, **5**, p. 379.
- BARCROFT J. — 1925. The respiratory function of the blood. Cambridge.
- BARNES L. A. — 1931. Do broth culture filtrates contain a bacterial growth inhibiting substance. *J. Bact.*, **21**, p. 395.
- BAYNES Jones S. — 1929. Bacterial calorimetry. I. General considerations. Description of a differential microcalorimeter. *J. Bact.*, **18**, p. 105.
- BAYNES Jones S. et RHEES M. S. — 1929. Bacterial calorimetry. II. Relationship of heat production to phases of growth in bacteria. *J. Bact.*, **17**, p. 123.
- BEERS C. D. — 1933. The relation of density of population to rate of reproduction in the ciliates *Didinium nasutum* and *Stylonichia pustula*. *Arch. f. Prot.*, **80**, p. 36.
- BESREDKA A. — 1923. Etudes sur l'immunité locale. Staphylocoque : cutivaccination et cuti-immunité. *C. R. S. B.*, **88**, p. 1273.
— 1923. Etudes sur l'immunité locale. Le pansement antistaphylococcique. *C. R. S. B.*, **89**, p. 7.
- BESREDKA A. et GOLOVANOFF M. — 1923. De la vaccination anticholérique, étude sur l'immunité locale. *C. R. S. B.*, **89**, p. 933.
- BESREDKA et URBAIN. — 1923. Etudes sur l'immunité locale. Le pansement antistreptococcique. *C. R. S. B.*, **89**, p. 506.
- BOHN G. et DRZEWINA A. — 1920. Variations de la sensibilité à l'eau douce des *Convoluta* suivant les états physiologiques et le nombre des animaux en expérience. *C. R.*, **171**, p. 1023.
— 1923. Action toxique du rouge neutre en présence de la lumière. *C. R. S. B.*, **89**, p. 386.
- BOHN J. et DRZEWINA A. — 1932. Accélération et inhibition de la croissance des plantes par l'argent métallique. *C. R. S. B.*, **109**, p. 638.
- BROOM J. C. — 1929. The exhaustion of media in bacterial cultures. *Brit. Jour. Exp. Path.*, **10**, p. 71.
- BUCHANAN R. E. — 1918. Life phases in bacterial cultures. *J. of infectious Diseases*, **23**, p. 109.

- BUCHANAN R. E. — 1928. Growth curves of Bacteria in JORDAN et FALK, chap. X (v. ce nom).
- BUCHANAN et FULMER. — 1928. Physiology and biochemistry of bacteria. William et Wilkins, Baltimore.
- BUCHNER, LONGARD K. et RIEDLIN G. — 1887. Ueber die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. *Centralblatt f. Bakt u. Par.*, **2**, p. 1.
- BURTON A. C. — 1936. The basis of the principle of the master reaction in biology. *J. Cell Comp. Physiol.*, **9**, p. 1.
- BUTTERFIELD C. T. — 1929. Experimental studies of natural purification of polluted waters. III. A note on the relation between food concentration in liquid media and bacterial growth. *U. S. Public Health Rep.*, **44**, p. 2865.
- CARLSON T. — 1913. Ueber Geschwindigkeit u. Größe des Hefevermehrung in Würze. *Biochem. Zeitschr.*, **57**, p. 313.
- CHEJFEC M. — 1929. Die Lebensdauer von *P. Caudatum* in Abhängigkeit von der Nahrungsmenge. *Acta Biol. Exp.*, **4**, p. 73.
- CHESNEY A. M. — 1916. The latent period in the growth of bacteria. *J. Exp. Medicine*, **24**, p. 387.
- CHOUARD (P.) et TEISSIER (G.). — 1932. Variations de l'intensité de croissance chez les plantules de Melon au cours du développement et en fonction de la quantité de réserves disponibles. *C. R.*, **194**, p. 1976.
- CLARK P. F. — 1928. Morphological changes during the growth of Bacteria, in JORDAN et FALK, chap. IV (v. ce nom).
- CLARK P. F. et RUEHL W. H. — 1919. Morphological changes during the growth of Bacteria. *J. of Bact.*, **4**, p. 615.
- CLEARY J. P. BEARD et CLIFTON. — 1935. On certain factors influencing the size of bacterial populations. *J. Bact.*, **29**, p. 205.
- CLIFTON C. E. — 1937. A comparison of the metabolic activities of *Aerobacter aerogenes*, *Eberthella colityphi*, and *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **33**, p. 145.
- CLIFTON C. E. et LOGAN W. A. — 1939. On the relation between respiration and assimilation in suspensions and in cultures of E. Coli. *J. Bact.*, **37**, p. 523.
- COHEN B. et CLARK M. — 1914. The growth of certain bacteria in media of different H ion concentration. *J. of Bact.*, **4**, p. 409.
- COPLAN. — 1910. Influences affecting the growth of micro organisms. Latency, inhibition, mass action. *J. of Pathology and Bact.*, **14**, p. 1.
- CROZIER W. J. — 1924. On the critical thermal increment for the locomotion of a Diplopod. *J. Gen. Physiol.*, **7**, p. 123.
- 1924. On biological oxidations as a function of temperature. *J. Gen. Physiol.*, **7**, p. 189.
- 1926. Note on the distribution of critical temperatures for biological processes. *J. Gen. physiol.*, **9**, p. 525.
- 1926. The distribution of temperature characteristics for biological processes : critical increments for heart rate. *J. Gen. Physiol.*, **9**, p. 531.
- CUTLER D. W. et CRUMP L. M. — 1923. The rate of reproduction in artificial cultures of *C. Colpoda*. *I. Biochem J.*, **17**, p. 174.
- 1923. The rate of reproduction in artificial cultures of *C. Colpoda*. II. *Biochem. J.*, **17**, p. 878.

- 1924. The rate of reproduction in artificial cultures of *C. Colpoda*. III. *Biochem. J.*, **18**, p. 905.
- 1925. The influence of washing upon the reproductive rate of *C. Colpoda*. *Biochem. J.*, **19**, p. 450.
- DAVID R. — 1931. Contribution à l'étude numérique de la multiplication du Bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides. Influence de la teneur du milieu en certains éléments nutritifs. Thèse Paris.
- DEBIESSE J. — 1939. Contribution physico-chimique à l'étude du métabolisme du *B. tuberculeux*, B. C. G. *Arch. I. P. Tunis*, **23**, p. 136.
- DENIGÈS, CHELLE et LAEAT. — 1930. Précis d'analyse chimique quantitative. Maloine, Paris.
- DESCHAMPS J. J. — 1902. Principes de la Biologie rationnelle. *Bull. Soc. philom.* Paris, **4**, p. 127.
- DIENERT. — 1900. Sur la fermentation du galactose, et sur l'accoutumance des levures à ce sucre. *Ann. Past.*, **14**, p. 139.
- DRZEWINA A. et BOHN G. — 1921. Variations de la susceptibilité aux agents nocifs avec le nombre des animaux traités. *C. R.*, **172**, p. 485.
- 1921. La défense des animaux groupés vis-à-vis des agents nocifs. *C. R.*, **172**, p. 779.
- 1921. Action nocive de l'eau sur des *Stentors* en fonction de la masse du liquide. *C. R. S. B.*, **84**, p. 917.
- 1921. Variation dans le temps de la résistance chez *Rana fusca*. *C. R. S. B.*, **84**, p. 963.
- 1921. Sur les phénomènes d'auto-protection et d'auto-destruction chez les animaux aquatiques. *C. R.*, **173**, p. 107.
- 1922. Sur les phénomènes d'auto-destruction et d'auto-agglutination chez les *Convolutés*. *C. R.*, **174**, p. 330.
- 1923. Effets tardifs de la dilution du sperme sur le développement de l'œuf d'Oursin. *C. R.*, **177**, p. 79.
- 1923. Variations dans le temps du pouvoir fécondant du sperme d'Oursin traité par des substances nocives, en rapport avec son degré de dilution. *C. R. S. B.*, **89**, p. 383.
- DUCLAUX E. — 1899. Traité de microbiologie. Masson et C^{ie}, Paris.
- EFFRONT J. — 1924. De l'influence de la constance du milieu sur le développement et le travail chimique des micro-organismes. *C. R. S. B.*, **91**, p. 1175.
- EIJKMAN C. — 1904. Ueber thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachtungshemmung der Mikroorganismen. *Centralblatt f. Bakt und Par.*, **37**, p. 436.
- EPHRUSSI B. et TEISSIER G. — 1932. Etude quantitative de la croissance des cultures de tissus. I. La croissance résiduelle. *Arch. exp. Zellforsch.*, **13**, p. 1.
- ESTY J. R. et MEYER K. F. — 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. *J. Infect. Dis.*, 1922, **31**, p. 650.
- FAGUET M. — 1935. Etude photométrique de la multiplication microbienne. *C. R.*, **200**, p. 498.
- 1935. Une nouvelle méthode d'étude de la multiplication microbienne. *C. R.*, **194**, p. 1763.

- 1935. Diagnostic photométrique du bacille d'Eberth du para A, du para B, du Colibacille. *C. R.*, **200**, p. 1637.
- 1941. Enregistrement photoélectrique continu de la multiplication microbienne. Applications à la physiologie bactérienne. Thèse Ing. Docteur, Paris.
- FISCHER E. — 1898. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Ztschr. Physiol. Chem.*, **23**, p. 60.
- FRIEDLEIN F. — 1928. Der quantitative Verwendungsstoffwechsel des *Paratyphus-B. bazillus*, des *B. coli* und des *B. pyocyaneus*. *Biochem. Zeitschr.*, **194**, p. 273.
- FROUIN A., GUILLAUMIE M. — 1928. Culture du B. tuberculeux sur milieux synthétiques. Essai de généralisation de la notion d'équilibre entre les éléments constitutifs des milieux de culture. *Ann. Inst. Past.* **42**, p. 667.
- 1926. Nutrition minérale du b. tuberculeux. *Bull. Soc. chim. biol.*, **8**, p. 1151.
- 1926. Nutrition carbonée du b. tuberculeux. *Bull. Soc. chim. biol.*, **8**, p. 1178.
- 1924. — Influence des sels de fer sur le rendement en poids du bacille tuberculeux. Action de ces sels sur l'utilisation de la glycérine. *C. R. S. B.*, **90**, p. 831.
- GARROD L. P. — 1936. Allelocatalysis. *J. Path. and Bact.*, **42**, p. 535.
- GAUSE G. F. — 1932. Ecology of populations. *Quart. rev. Biol.*, **7**, p. 27.
- GAUSE G. F. et ALPATOV W. W. — 1931. Die logistische Kurve von Verhulst-Pearl und ihre Anwendung im Gebiet der quantitativen Biologie. *Biol. Zentralblatt.*, **51**, p. 1.
- GRAHAM-SMITH G. S. — 1920. The behavior of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the number of living organisms. *J. Hygiene*, **19**, p. 133.
- GRAY J. — 1928. The growth of fish. II. The growth rate of the embryo of *Salmo fario*. *Brit. Jr. Exp. Biol.*, **6**, p. 110.
- 1928. The growth of fish III. The effect of temperature on the development of the eggs of *Salmo fario*. *Brit. Jr. Exp. Biol.*, **6**, p. 125.
- GREAVES J. E., GREAVES J. D., HICKMAN I. — 1934. The growth and metabolism of mixed culture of ammonia producing microorganisme. *J. Bact.*, **28**, p. 164.
- GREENLEAF W. E. — 1924. The influence of volume of culture medium and cell proximity on the rate of reproduction of protozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **21**, p. 405.
- 1926. The influence of volume of culture media and cell proximity on the rate of reproduction of *Infusoria*. *J. Exp. Zool.*, **46**, p. 143.
- GRIMWALD E. — 1928. Recherches sur les facteurs du développement des cultures de micro-organismes. L'action de la substance allelocatalytique apparaît-elle dans les cultures de *C. Colpoda*. *Acta Biol. Exp.*, **3**, p. 81.
- HAINES R. B. — 1933. On the influence of CO² on the rate of multiplication of certain bacteria as judged by viable counts. *Chem. and Ind.*, **52**, p. 136.
- HAMMETT F. S. — The chemical stimulus for growth by increase in cell number. *Protoplasma*, **7**, p. 297.

- HAMPIL B. — 1932. The influence of temperature on the life processes and death of Bacteria. *Quart. rev. biol.*, **7**, p. 172.
- HEGARTY C. P. — 1939. Physiological youth as an important factor in adaptive enzyme formation *J. Bact.*, **37**, p. 145.
- HENRICI A. T. — 1921. A statistical study of the form and growth of a spore bearing Bacillus. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **21**, p. 215.
- 1923. Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **20**, p. 293.
- 1923. A statistical study of the form and growth of *B. coli*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **21**, p. 215.
- 1924. Influence of concentration of nutrients on size of cells of *B. megatherium*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **21**, p. 343.
- 1924. Influence of age of parent culture on size of cells of *B. megatherium*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **21**, p. 345.
- 1928. Morphologic variation and the rate of growth of bacteria C. C. Thomas, Springfield et Baltimore.
- HERRINGTON B. L. — 1934. A note regarding the lag period. *J. Bact.*, **28**, p. 177.
- HERSHEY A. D. — 1938. Factors limiting bacterial growth I. Growth without lag in *B. coli* cultures. *Proc. Soc. Ex. Biol. and Med.*, **38**, p. 127.
- 1939. Factors limiting Bacterial growth IV. The age of the parent culture and the rate of growth of transplants of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **37**, p. 285.
- 1939. Factors limiting bacterial growth. VI. Equations describing the early period of increase. *J. Gen. Physiol.*, **23**, p. 11.
- HERSHEY A. D. et BRONFENBRENNER. — 1938. Factors limiting bacterial growth. III. Cell size and « physiologic youth » in *B. coli*. *J. Gen. Physiol.*, **21**, p. 721.
- HOAGLAND H. — 1937. Master reaction and temperature characteristic. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **10**, p. 29.
- HUNTINGTON E. et WINSLOW C. E. A. — 1937. Cells size and metabolic activity at various phases of bacterial cultures. *J. Bact.*, **33**, p. 123.
- JACQUOT R. — 1936. Biochimie et bioénergétique du *Sterigmatocystis nigra*. I, II, III, *Ann. Physiol.*, **13**, p. 1 ; IV, *Ann. Physiol.*, **13**, p. 209.
- JAHN T. L. — 1934. Problems of Population growth in Protozoa. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **2**, p. 167.
- JENNISON M. W. — 1935. Some quantitative relationships in bacterial population cycles. *J. Bact.*, **30**, p. 603.
- JOHNSON W. H. — 1933. Effects of population density on the rate of reproduction in *Oxytricha*. *Physiol. Zool.*, **6**, p. 22.
- JOHNSON F. H. — 1936. The aerobic oxidation of carbohydrates by luminous bacteria and the inhibition of oxidation of certain sugars. *J. Cell. comp. Physiol.*, **8**, p. 439.
- 1937. Hexose oxidation by luminous bacteria. I. The effect of some natural and synthetic glucosides and related substance. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **9**, p. 199.
- 1938. Hexose oxidation by luminous bacteria. III. The escape of respiration and luminescence from inhibition by α méthylglucoside with a note on urethanes. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **12**, p. 281.

- JOHNSON F. H. et ANDERSON R. S. — 1938. Hexose oxidations by luminous bacteria. II. The inhibition of glucose oxidation by alphas-methylglucosides. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **12**, p. 273.
- JORDAN et FALK. — 1928. The Newer knowledge of bacteriology and immunology. Un. Chicago Press.
- KAPLAN A. — 1931. Influence du nombre de microbes ensemencés sur la multiplication du Bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. Thèse Doct. Pharm. Paris.
- KARSTRÖM H. — 1930. Ueber die Enzyymbildung in Bakterien und über einige physiologische Eigenschaften der untersuchten Bakterienarten. Thèse Helsingfors.
- Enzymatische adaptation bei mikroorganismus. *Ergebnisse f. Enzymforschung.*, **7**.
- KENDALL A. I. — 1928. The utilization of carbohydrates by Bacteria, ch. XVI de JORDAN et FALK (v. ce nom).
- KENDALL A. I. Bly R. et HANER R. C. — 1923. Carbohydrate configuration and bacterial utilization. *J. Infect. Dis.*
- KENDALL A. I. et GROSS C. E. — 1930. The utilization of certain substituted carbohydrates by bacteria. Studies in bacterial metabolism XCVI. *J. infect. Diseases*, **47**, p. 249.
- KENDRICK Mac et PAI. — 1911. The rate of multiplication of micro-organisms. A mathematical study. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh.*, **31**, p. 649.
- KLEMM D. et POE C. F. — 1936. A study of methods for determination of reducing sugars in bacterial cultures. Colorimetric methods. *J. Bact.*, **32**, p. 1.
- KOCHOLATY W. et WEIL I. — 1938. Enzymic adaptation in *Clostridium histolyticum*. *Biochem. J.*, **32**, p. 1696.
- KOSER S. et SAUNDERS F. — 1933. The utilization of certain sugars and their derivatives by bacteria. *J. Bact.*, **26**, p. 475.
- LANE CLAYTON J. E. — 1909. — Multiplication of Bacteria and the influence of temperature and some other conditions *J. of Hygiene*, **9**, p. 239.
- LEWIS. — 1934. Bacterial variation. *J. Bact.*, **28**, p. 619.
- LEDINGHAM J. G. G. et PENFOLD W. J. — 1914. Mathematical analysis of the lag phase in bacterial growth *J. of Hygiene*, **14**, p. 242.
- LILLIE F. R. — 1919. Problems of Fertilization. Univ. Chicago Press.
- LONGSWORTH L. G. et MAC INNES B. A. — 1935. Bacterial growth with automatic pH control. A) An apparatus. B) Some tests on the acid production of *Lactobacillus acidophilus* *J. Bact.*, **29**, p. 595.
- 1936. Bacterial growth at constant pH : quantitative studies on the physiology of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bact.*, **31**, p. 287.
- 1936. Bacterial growth at constant pH. Apparent ox-red potentials, acid production, and population studies of *Lactobacillus acidophilus* under anaerobic conditions. *J. Bact.*, **32**, p. 567.
- LOOFBOUROW J. R. et DWYER C. M. — 1938. Relative consistency of weights and counts in determining microorganism populations by photoelectric Nephelometers. *Studies of the Institutum divi Thomae*, **2**, p. 129.
- LUDWIG W. — 1928. Ueber den funktioneller Zusammenhang zwischen Populationsdichte, Nahrungsdichte und Teilungsrate bei Protisten und

- über die Zunahme der Bevölkerungsdichte überhaupt. *Biol. Generalis*, **4**, p. 351.
- LWOFF A. et AUDUREAU A. — 1941. Sur une mutation de *Moraxella lwoffii* apte à se développer dans les milieux à l'acide succinique, *Ann. Past.*, **67** p. 94.
- Mc PHERSON, SMITH et BANTA. — 1932. New data with possible bearings upon Robertson's, theory of allelocatalysis. *Anat. Rec.*, **54**, p. 23.
- MAGGEE M. C. et SMITH H. G. — 1930. A study of methods for the estimation of reducing sugars in bacteriological media. *J. Bact.*, **19**, p. 125.
- MARCHAL. — 1932. Variation et mutation en Bactériologie. Paris, Le François.
- MARTIN D. S. — 1932. The oxygen consumption of *Escherichia coli* during the lag and logarithmic phases of growth. *J. Gen. Physiol.*, **15**, p. 691.
- MASON M. M. — 1935. A comparison of the maximal growth rates of various bacteria under optimal condition. *J. Bact.*, **29**, p. 103.
- MASSINI. — 1907. Über einen in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm: *B. coli mutabile*. *Arch. f. Hyg.*, **61**, p. 250.
- MEUNIER P. — 1936. L'électrophotomètre pratique en chimie biologique. *Ann. Fermentations*, **2**, p. 278.
- MONOD J. — 1935. Le taux de croissance en fonction de la concentration de l'aliment, dans une population de *Glaucoma piriformis* en culture pure. *C. R.*, **201**, p. 1513.
- 1937. Ration d'entretien et ration de croissance dans les populations bactériennes. *C. R.*, **205**, p. 1456.
- 1941. Croissance des cultures bactériennes en fonction de la concentration de l'aliment hydrocarboné. *C. R.*, **212**, p. 771.
- 1941. Sur un phénomène nouveau de croissance complexe dans les cultures bactériennes. *C. R.*, **212**, p. 934.
- MONOD J. et MORIN F. — 1942. Sur l'expression analytique de la croissance des cultures bactériennes. *Rev. Scient.*
- MONOD J. et TEISSIER G. — 1935. La concentration de l'aliment, facteur quantitatif de l'accroissement des populations d'Infusoires. *C. R.*, **202**, p. 162.
- MULLER Max. — 1895. Ueber den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhus Bazillus. *Zeitsch. f. Hygiene*, **20**, p. 118.
- PEARL R. — 1924. — The curve of population growth. *Proc. Amer. Phil. Soc.*, **63**, p. 10.
- 1925. The biology of population growth. New York, Knopf.
- 1927. The growth of Populations. *Quart. Rev. Biol.*, **2**, p. 532.
- 1928. The rate of living. New York, Knopf.
- PEARL R. et REED L. J. — 1920. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **6**, p. 275.
- 1922. A further note on the mathematical theory of population growth. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **8**, p. 365.
- 1923. On the mathematical theory of population growth. *Metron*, **3**, p. 6.
- PEDERSON C. S., YALE M. W. et EGLINTON R. — 1933. Temperature varia-

- tions in bacteriological incubators. *N. Y. State Agric. Exp. Stat. Rec. Bull.*
- PENFOLD W. J. — 1914. On the nature of bacterial lag. *Jr. of Hyg.*, **14**, p. 215.
- PENFOLD W. J. et NORRIS, 1912. — The relation of concentration of food supply to generation time of Bacteria. *Jr. of Hygiene*, **12**, p. 257.
- PHELPS A. — 1935. Effect of H. ion concentration on the division rate of *P. Aurelia*. *Science*, **74**, p. 395.
- 1935. Growth of protozoa in pure cultures. I. Effect upon the growth curve of the age of the inoculum and amount of the inoculum. *Jr. Exp. Zool.* **70**, p. 109.
- 1936. Growth of protozoa in pure cultures. II. Effect upon the growth curve of different concentrations of nutrient material. *J. Exp. Zool.*, **72**, p. 474.
- PULLEY H. C. et GREAVES J. D. — 1932. An application of the autocatalytic growth curve to microbial metabolism. *J. Bact.*, **24**, p. 145.
- QUASTEL J. H. — 1926. Dehydrogenations produced by resting bacteria. IV. A theory of the mechanism of oxydations and reductions in vivo. *Biochem. Jr.*, **20**, p. 166.
- 1932. Bacterial enzyme reactions. *Erg. Enzymforsch.*, **1**, p. 209.
- 1937. Enzyme formation in Bacteria. *Enzymologia*, **2**, p. 37.
- QUASTEL J. H. et WETHAM M. D. — 1925. Dehydrogenations produced by resting bacteria. I. *Biochem. Jr.*, **19**, p. 520 ; II. *Biochem. Jr.*, **19**, p. 645.
- QUASTEL J. H. et WOOLDRIDGE W. R. — 1925. Dehydrogenations produced by resting bacteria. *Biochem Jr.*, **19**, p. 652.
- QUASTEL J. H. et WOOLDRIDGE. — 1927. Experiments on Bacteria in relation to the mechanism of enzyme action. *Biochem. Jr.*, **21**, p. 1225.
- 1928. Some properties of dehydrogenating enzymes of Bacteria. *Biochem. J.*, **22**, p. 689.
- RAHN Otto. — 1906. Ueber den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. *Centralblatt f. Bakt u. Par.*, II Abt., **16**, p. 417.
- 1929. The non logarithmic order of death of some bacteria. *J. Gen. Physiol.*, **13**, p. 395.
- 1929. The size of Bacteria as the cause of logarithmic order of death. *J. Gen. Physiol.*, **13**, p. 179.
- 1932. Physiology of Bacteria. Blakiston and Co, Philadelphia.
- RAHN O., HEGARTY C. P. et DEVEL R. C. — 1938. Factors influencing the rate of fermentation of *Streptococcus lactis*. *J. Bact.*, **35**, p. 547.
- RAULIN. — 1870. Etudes chimiques sur la végétation. Thèse Paris.
- RÉGNIER J., DAVID, R., MORCHOISNE J. — 1935. De l'influence du glucose et des éléments minéraux sur la multiplication du bacille pyocyanique. *C. R. S. B.*, **120**, p. 415.
- 1935. Influence de la constitution des peptones sur la multiplication du bacille pyocyanique. *C. R. S. B.*, **120**.
- RÉGNIER J. et KAPLAN. — 1932. Contribution à l'étude numérique de la multiplication bactérienne. *C. R. Ac. Sc.*, **194**, p. 323.
- RÉGNIER J. et LAMBIN S. — 1927. Introduction à l'étude des antiseptiques. Etude numérique du croît de *B. pyocyanique* dans un milieu de culture liquide. *Bull. Soc. Pharmacol.*, **34**, p. 401.

- 1941. Influence de la grandeur de l'ensemencement (ensemencements massifs) sur la multiplication bactérienne. *C. R. Soc. Biol.*, **135**, p. 267.
- 1941. Comparaison des variations de forme des bactéries dans un même milieu suivant la grandeur de l'ensemencement. *C. R. Soc. Biol.*, **135**, p. 275.
- RICHARDS O. W. — 1925. The growth of the yeast *S. Cerevisiae*. A mathematical analysis of its growth curve and the effect of temperature on its growth as shown by the Arrhenius equation of temperature. Thesis, Oreg. Univ.
- 1928. The rate of multiplication of yeast at different temperatures. *J. Phys. Chem.*, **32**, p. 1865.
- 1928. Changes of size of yeast cells during multiplication. *Bot. Gazette*, **86**, p. 93.
- 1928 a. The growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. I. The growth curve, its mathematical analysis and the effect of temperature on yeast growth. *Ann. Bot.*, **43**, p. 271.
- 1928 b. Potentially unlimited multiplication of yeast with constant environment and the limiting of growth by changing environment. *J. Gen. Physiol.*, **11**, p. 525.
- 1932. The second cycle and subsequent growth of a population of yeast. *Arch. f. Protistenk*, **73**, p. 263.
- ROBERTSON T. B. — 1921. Experimental studies on cellular multiplication. Part I *Biochem. J.*, **15**, p. 595. Part II *Biochem. J.*, **15**, p. 612.
- 1921. Reproduction in cell communities. *J. of Physiology*, **56**, p. 403.
- 1923. The chemical basis of growth and senescence Lippincott, New-York.
- 1924. Allelocatalytic effects in cultures of *Colpidium* in hay infusions and in synthetic media. *Biochem. J.*, **18**, p. 1240.
- 1924. The nature of the factors which determine the duration of the period of lag in cultures of Infusoria. *Austral. J. Exp. Biol. and Med.*, **1**, p. 105.
- 1924. The influence of washing upon isolated infusoria and upon the allelocatalytic effect in cultures initially containing two infusoria. *Austral. J. Exp. Biol. Med.*, **1**, p. 151.
- ROGERS L. A. et WHITTIER E. O. — 1926. Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bact.*, **16**, p. 211.
- 1930. The growth of bacteria in a continuous flow of broth. *J. Bact.*, **20**, p. 127.
- ROGERS L. A. et GREENBANK G. R. — 1930. The intermittent growth of bacterial cultures. *J. Bact.*, **19**, p. 181.
- ROTTIER P. B. — 1936. Recherches sur la croissance de *Polytoma uvella*. L'influence de la concentration des substances nutritives. *C. R. S. B.*, **122**, p. 776.
- 1936. Recherches sur les courbes de croissance de *Polytoma uvella*. L'influence de l'oxygénation. *C. R. S. B.*, **122**, p. 65.
- SCHLAYER C. — 1936. The influence of oxygen tension on the respiration of pneumococci (type I). *J. Bact.*, **31**, p. 181.
- SHERMAN J. M. et ALBUS W. R. — 1923. Physiological youth in bacteria. *J. of Bact.*, **8**, p. 127.
- 1924. The function of lag in bacterial cultures. *J. of Bact.*, **9**, p. 303.

- SHOOP CHARLES S. — 1930. The respiration of luminous bacteria and the effect of oxygen tension upon oxygen consumption. *J. Gen. Physiol.*, **13**, p. 27.
- SLATOR A. — 1917. A note on the lag phase in the growth of micro organisms. *J. of Hygiene*, **16**, p. 100.
- 1921. Yeast crops and the factors which determine them. *J. of Chem. Soc.*, **119**, p. 115.
- SOHNGREN et COOLHAAS. — 1924. Fermentation of galactose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, **9**, p. 131.
- STARK C. N., SHERMAN J. M. et STARK P. — 1928. Glucose inhibition of extra-cellular toxin producing enzymes of *Clostridium botulinum*. *J. Infect. Dis.*, **43**, p. 566.
- STEINHAUS E. A. et BIRKELAND J. M. — 1939. Studies on the life and death of bacteria. The senescent phase in aging culture and the probable factors involved. *J. Bact.*, **38**, p. 249.
- STEPHENSON. — 1939. Bacterial Metabolism, Longmans.
- STEPHENSON et GALE. — 1937. The adaptivity of Glucozymase and Galactozymase in *B. coli*. *Biochem. J.*, **31**, p. 1311.
- STEPHENSON et STICKLAND. — 1933. The adaptivity of glucozymase and galactozymase in *B. coli*. *Biochem J.*, **27**, p. 1528.
- STEPHENSON et YUDKIN. — 1936. Galactozymase considered as an adaptive enzyme. *Biochem J.*, **30**, p. 506.
- TAMIYA H. — 1935. Le bilan matériel et l'énergétique des synthèses biologiques. *Actualités scient. et ind.*, n° 214. Hermann, Paris.
- TEISSIER G. — 1928. Croissance des populations et croissance des organismes. Examen historique et critiques de quelques théories. *Ann. Physiologie*, **3**, p. 342.
- 1933. Les lois élémentaires de la croissance. *Ann. et Bull. Soc. Roy. Sc. et Med. Bruxelles*, nos 3-4, p. 1.
- 1934. Recherches sur le vieillissement et sur les lois de mortalité. I. Introduction historique. *Ann. Physiologie*, **10**, p. 237.
- 1934. Recherches sur le vieillissement et sur les lois de mortalité. II. Essai d'interprétation générale des courbes de survie. *Ann. Physiol.*, **10**, p. 261.
- 1936. Description quantitative de quelques croissances complexes. *Ann. Physiologie*, **10**, p. 359.
- 1936. Les lois quantitatives de la croissance. *Ann. Physiologie*, **12**, p. 527.
- TERROINE, TRAUTMANN, BONNET, HEE. — 1926. L'énergie de croissance. IV. Les rendements énergétiques dans le développement des micro-organismes et dans la germination, en fonction de la concentration des aliments et de l'oxygène, et le problème de la consommation de luxe. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **8**, p. 586.
- TERROINE E. et WURMSER R. — 1922. L'énergie de croissance. I. Le développement de *Aspergillus niger*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **4**, p. 519.
- VERHULST P. F. — 1838. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corr. math. et phys. publ. par A. Quetelet*, t. X, p. 113.
- 1845. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Nouv. Mém. de l'Acad. Roy. des Sc. et Belles-Lettres de Bruxelles*, **18**, p. 1.

- 1847. Deuxième mémoire sur la loi d'accroissement de la population. *Nouv. Mém. de l'Acad. Roy. des Sc. et Belles-Lettres de Bruxelles*, **20**, p. 1.
- VIRTANEN A. I. — 1934. On the enzymes of Bacteria and bacterial Metabolism. *J. Bact.*, **28**, p. 447.
- VLES fr. — 1919. Sur la signification des dosages bactériens. *C. R. S. B.*, **82**, p. 373.
- 1921. Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. Phys. Biol.*, **1**, p. 189.
- WALKER H. H. — 1932. CO₂ as a factor influencing lag in bacterial growth. *Science*.
- WALKER H. H. et WINSLOW C. E. A. — 1932. Metabolic activity of the bacterial cell at various phases of the population cycle. *J. Bact.*, **24**, p. 209.
- WALKER, WINSLOW et MOONEY. — 1934. Bacterial cell metabolism under anaerobic conditions. *J. Gen. Physiol.*, **17**, p. 349.
- WALKER, WINSLOW, HUNTINGTON, MOONEY. — 1934. The physiological youth of a bacterial culture as evidenced by cell metabolism. *J. Bact.*, **27**, p. 203.
- WARBURG O., KUBOWITZ F. — 1931. Atmung bei sehr kleinen Sauerstoffdrucken. *Biochem Zeitsch.*, **214**, p. 5.
- WEDUM A. G. et GOLDEN B. L. — 1937. The carbohydrate gradient of certain microorganisms. *J. Infect. Dis.*, **60**, p. 94.
- WINSLOW C. E. A. — 1927. The rise and fall of bacterial populations in JORDAN et FALK, chap. VI.
- WINSLOW C. E. A., WALKER H. H. et SUTERMEISTER. — 1932. The influence of aeration and of sodium chloride upon the growth curve of bacteria in various media. *J. Bact.*, **24**, p. 185.
- WOODRUFF L. L. — 1911. The effects of excretion products of *Paramoecium* on its rate of reproduction. *J. Exp. Zool.*, **10**, p. 557.
- 1913. The effects of excretion products of Infusoria on the same and on different species with special reference to the protozoan sequence in infusions. *J. Exp. Zool.*, **14**, p. 575.
- WOOLDRIDGE, KNOX et GLASS. — 1936. Variability in the activity of bacterial enzymes. I. The effect of the age of the culture. *Biochem. J.*, **30**, p. 926.
- WOOLDRIDGE W. R. et GLASS V. — 1937. Variability in the activity of bacterial enzymes. II. Factors associated with viability and growth. *Biochem J.*
- YOCOM H. B. — 1928. The effect of the quantity of culture medium on the division rate of *Oxytricha*. *Biol. Bull.*, **54**, p. 410.
- YUDKIN. — 1938. Enzyme variation in microorganisms. *Biol. Rev.*, **13**, p. 93.



TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE	
CHAPITRE I. — Les phases de la croissance.....	5
CHAPITRE II. — Méthodes de culture et de mesure.....	22
CHAPITRE III. — Le rendement en fonction de la concentration des aliments	34
CHAPITRE IV. — Le taux de croissance en fonction de la concentration des aliments	58
CHAPITRE V. — Le rendement en fonction du taux de croissance.....	85
CHAPITRE VI. — Le rendement au cours de la croissance.....	97
CHAPITRE VII. — Les coefficients de température des constantes de croissance	106
CHAPITRE VIII. — L'expression analytique de la croissance.....	116
Résumé et conclusions de la première partie.....	135
DEUXIÈME PARTIE	
CHAPITRE I. — Le phénomène de diauxie	139
CHAPITRE II. — La nature du phénomène de diauxie	166
CHAPITRE III. — Le mécanisme du phénomène de diauxie	184
Résumé et conclusions de la deuxième partie.....	198
BIBLIOGRAPHIE	200



DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Le Galvanotropisme des Infusoires ciliés.

Vu et approuvé :

Paris, le 12 décembre 1941.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

P. MONTEL.

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

GILBERT GIDEL.

